

Aus der Klinik für Dermatologie
der Medizinischen Fakultät
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunhistologische Untersuchungen an primären Melanomen und
deren Metastasen mit SM5-1, einem neuen monoklonalen
Antikörper

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Susanne Reinke
aus Berlin

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Sterry
2. Prof. Dr. med. W. Stolz
3. Prof. Dr. med. K. Neuber

Datum der Promotion: 18.10.2004

Meiner Familie und Jan

*Was ist das Schwerste von allem?
Was dir das Leichteste dünket;
Mit den Augen zu sehen,
Was vor den Augen dir liegt.*

J. W. v. Goethe 1893

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition des malignen Melanoms	1
1.2 Klassifikation des malignen Melanoms	1
1.3 Metastasierung des malignen Melanoms	3
1.4 Differentialdiagnose des malignen Melanoms	3
1.5 Epidemiologie und Risikofaktoren	3
1.6 Einteilungen des malignen Melanoms	4
1.7 Diagnostik	9
1.7.1 Immunhistologie	9
2. Fragestellung	12
3. Material und Methoden	14
3.1 Gewebeproben	14
3.2 Gewebearten	14
3.3 Herstellung von Paraffinschnitten	14
3.4 Entparaffinierung und Gewebevorbehandlung	15
3.5 Generierung des Antikörpers SM5-1	16
3.6 Verwendete Antikörper	17
3.7 Immunhistochemisches Färben	18
3.7.1 Avidin/Streptavidin-Biotin-Methode	18
3.7.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen	19
3.8 Auswertung der histologischen Schnitte	20
3.9 Übersicht verwendeter Materialien und Geräte	21
4. Ergebnisse	23
4.1 Die Expression des durch SM5-1 erkannten Antigens in der Haut und anderen normalen humanen Geweben	23
4.2 Melanozytäre Nävi	25

4.3	Färbungen durch den Antikörper SM5-1 bei nicht-melanozytären Tumoren	25
4.4	Immunhistochemisches Färbeverhalten von SM5-1 an primären malignen Melanomen	28
4.5	Immunhistochemie des monoklonalen Antikörpers SM5-1 bei Melanommetastasen	28
4.6	Vergleich der Antigenexpression des Antikörpers SM5-1 in primären Melanomen mit Antikörpern gegen Melan-A/MART-1 (A103) und Tyrosinase (T311)	31
4.7	Antigenexpression des Antikörpers SM5-1 im Vergleich mit anti-Melan-A/MART-1 und anti-Tyrosinase an Melanommetastasen	32
4.8	Expression von SM5-1, Melan-A/MART-1 und Tyrosinase bei primären und metastasierten Melanomen	32
4.9	Färbeintensitäten von SM5-1, A103 und T311 bei primären und metastasierten Melanomen	34
4.10	Konkordanter Verlust der Antigene für Melan-A/MART-1 und Tyrosinase bei primären oder metastasierten Melanomen	35
5.	Diskussion	37
5.1	Spezifität des Antikörpers SM5-1	37
5.2	Sensitivität des Antikörpers SM5-1 für primäre und metastasierte Melanome	39
5.3	Antigenexpression von SM5-1, Melan-A/MART-1 und Tyrosinase in primären und metastasierten Melanomen	41
5.4	Färbeintensitäten von SM5-1, A103 und T311	43
5.5	Färbemuster von SM5-1 innerhalb einer Tumorzellpopulation im Vergleich zu A103 und T311	43
5.6	Konkordanter Antigenverlust bei primären und metastasierten Melanomen	44
5.7	Schlussfolgerungen über den Antikörper SM5-1	44
6.	Zusammenfassung	46
7.	Literaturverzeichnis	VIII

8. Publikation	XV
9. Eidesstattliche Erklärung	XVI
10.Danksagung	XVII

1. Einleitung

1.1 Definition des malignen Melanoms

Maligne Melanome sind von den Melanozyten der Haut, seltener der Schleimhaut, der Aderhaut und den Leptomeningen ausgehende neuroektodermale Tumore. Melanozyten sind zur Melaninbildung befähigte Zellen, die sich in der epidermalen Basalschicht befinden. Sekretionsprodukt ist das elektronenmikroskopisch sichtbare Melanosom.⁽¹⁾ Aus Einzelzellproliferationen, in allen epidermalen Schichten vorkommend, entwickeln sich konfluierende Nester atypischer Melanozyten. Bei Überschreiten der Basalmembran ist der Übergang von einem Melanoma in situ in ein invasives Melanom, welches lymphogen oder hämatogen metastasieren kann, vollzogen. Melanome mit horizontaler Ausbreitungsrichtung zeigen eine geringere Wachstumstendenz als solche mit vorwiegend vertikaler Ausbreitung. Im Verlauf der Melanomentwicklung kann die horizontale Wachstumsphase in vertikales invasives Wachstum übergehen.⁽²⁾

1.2 Klassifikation des malignen Melanoms

Entsprechend des Wachstumsmusters bzw. der klinischen Erscheinungsform unterscheidet man im Hautbereich zwischen superfiziell spreitendem malignen Melanom (SSM), nodulärem malignen Melanom (NMM), Lentigo-maligna-Melanom (LMM), Akral-lentiginösem Melanom (ALM) sowie den nicht klassifizierbaren Melanomen und Sonderformen.⁽³⁾

SSM

Mit 50 - 70% aller Melanome tritt das SSM am häufigsten auf und entsteht bevorzugt um das 50. Lebensjahr. Es entwickelt sich oft über ein bis fünf Jahre aus einem vorbestehenden Nävus und wächst meist horizontal.⁽³⁻⁷⁾ Bis auf Handteller und Fußsohle ist jede Lokalisation möglich, wobei der Rücken/Rumpf bei Männern und die Waden/Beine bei Frauen den bevorzugten Sitz darstellen.⁽²⁾ Makroskopisch sieht man einen unterschiedlich pigmentierten, flachen Tumor, der scharf begrenzt ist und eventuell noduläre Areale aufweist. Histologisch imponieren große, plasmareiche Melanozyten, welche zum Teil in Nestern vorliegen und über alle Schichten der Epidermis verteilt sind.⁽⁷⁾

NNM

Als zweithäufigstes Melanom (15 - 30%) entwickelt sich das NMM recht schnell exo- oder endophytisch und hat die schlechteste Prognose von allen Melanomformen. Es entsteht überwiegend auf normaler Haut oder aber im Bereich und am Rand eines vorbestehenden Nävus.⁽³⁻⁷⁾ Das NMM betrifft hauptsächlich Männer, meist im mittleren Alter und tritt vor allem an Rumpf, Kopf und Nacken auf.⁽⁴⁾ Es erscheint dunkler als das SSM, ist zu ca. 5% jedoch amelanotisch.⁽³⁾ Ulzeration, Blutung und entzündliche Umgebungsreaktion sind typisch. Histologisch sind beim NMM große epitheloidzellige, spindelzellige oder kleine maligne Melanozyten zu finden, welche gemischt oder einzeln auftreten.^(3;7)

LMM

Das LMM hat einen Anteil von ca. 10% der malignen Melanome und bildet sich auf sonnengeschädigter Haut hauptsächlich im Gesicht. Betroffen sind vorrangig Frauen über dem 65. Lebensjahr.^(3;8) Dabei stellt die Lentigo maligna die obligate Präkanzerose dar, aus welcher sich über 5 - 15 Jahre das Melanom entwickelt.^(2;3) Hautflächen von 5 - 10 cm Größe werden von unscharf begrenzten, hellbraun bis schwarz pigmentierten Veränderungen eingenommen, wobei knotige Anteile Tiefenwachstum anzeigen.^(3;8) Entlang der dermo-epidermalen Grenzen liegen in dunkelpigmentierten planen Tumorarealen maligne Melanozyten.⁽⁷⁾

ALM

Ca. 2 - 5% der primären malignen Melanome sind im Bereich der Phalangen, Handinnenflächen und Fußsohlen zu finden. Mit 35 - 50% der Melanome bei schwarzen und asiatischen Völkern ist dieser Melanomtyp der dort am häufigsten vorkommende. Von dieser Krankheit sind hauptsächlich über 60-jährige Personen betroffen. Das ALM ähnelt dem LMM im makroskopischen und mikroskopischen Bild, wächst aber aggressiver als das LMM.^(3;5;9)

Sonderformen

Das im Bereich der Schleimhäute, besonders oroösophagotracheal und anorectal, vorkommende Melanom hat eine sehr schlechte Prognose und macht ca. 1% aller Melanome aus.⁽³⁾ Das Melanom der Uvea ist mit einer Inzidenz von ca. 0,7 - 1/100 000 Einwohner pro Jahr der häufigste Augentumor des Erwachsenen und kommt oftmals im hinteren Augenabschnitt vor. Zu den Sonderformen gehören außerdem das amelanotische Melanom, das desmoplastische Melanom und Melanome, die im Bereich der Konjunktiven und der Hirnhäute lokalisiert sind.^(2-4;9;10)

1.3 Metastasierung des malignen Melanoms

Die Metastasierung des Melanoms verläuft in Abhängigkeit von der Tumordicke zunächst überwiegend lymphogen in die loko-regionären Lymphknoten. Frühzeitig finden sich Metastasen mit Satelliten lokal um den Primärtumor oder auf dem Weg zu den regionalen Lymphknoten, sogenannte In-Transit-Metastasen. Diese stellen somit den häufigsten Ort der Metastasierung dar. Ca. 25% der Patienten können in diesem Stadium durch eine chirurgische Intervention kurativ versorgt werden.⁽³⁾ Bei späterer hämatogener Metastasierung kann grundsätzlich jedes Organ betroffen sein. Am häufigsten findet man Fernmetastasen der Haut, des Subkutangewebes, der Lymphknoten, der Lunge, der Leber, des Gehirns, der Knochen und des Intestinums. Insbesondere der viszerale Befall verläuft klinisch oft inapparent.^(2;3)

1.4 Differentialdiagnosen des malignen Melanoms

Prinzipiell kann sich hinter allen pigmentierten benignen und malignen Hautveränderungen ein malignes Melanom verbergen. Zu den häufigsten Differentialdiagnosen gehören nävoide, melanozytische, vaskuläre und dermale Veränderungen.⁽⁷⁾

1.5 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Melanom hat während der letzten Jahrzehnte zunehmend an Bedeutung gewonnen. In der Europäischen Gemeinschaft liegt die Inzidenz derzeit bei 8 - 12/100 000 Einwohner pro Jahr. In den Jahren 1970 bis 1980 war noch eine Inzidenz von ca. 4/100 000 Einwohner pro Jahr zu verzeichnen.⁽³⁾ In Australien und den Südstaaten der USA geht man von über 30 Neuerkrankungen je 100 000 Einwohner pro Jahr aus, wohingegen das Melanom in Südafrika und Südostasien mit weniger als einer Neuerkrankung pro 100 000 Einwohner und Jahr sehr selten auftritt.^(3;11-14) Nach jüngeren Schätzungen beträgt das Risiko für die Entwicklung eines Melanoms für einen im Jahre 2000 Geborenen 1:75. Für 1935 Geborene lag diese Wahrscheinlichkeit noch bei 1:1500, für 1980 Geborene noch bei 1:250.^(3;15)

Die Inzidenzzunahme lässt sich durch verschiedene Faktoren erklären. Die Kombination von mehr Freizeitaktivität unter Sonnenexposition, zunehmender UV-B-Strahlung, die die Erdoberfläche erreicht sowie früherer Melanomerkennung und eventueller genetischer Prädisposition ergeben wahrscheinlich einen additiven Effekt auf die Inzidenzentwicklung. Durch gezielte Aufklärungskampagnen kamen zudem in den letzten Jahren mehr Patienten zur frühzeitigeren Diagnosestellung.^(3,7)

Menschen mit hellem Pigmentierungstyp, d.h. Hauttypen I und II, einem Lebensraum in Äquatornähe, erworbenen melanozytären Läsionen oder vermehrt der Sonne ausgesetzten lichtempfindlichen Hautregionen, wie z.B. Körperstamm, gelten hinsichtlich der Entwicklung eines Melanoms als besonders gefährdet.⁽³⁾ Ein mehr als 100fach erhöhtes relatives Risiko zur Melanomentwicklung weisen Personen mit dysplastischen Nävuszellnävi bzw. familiärem Vorkommen von malignen Melanomen auf.⁽³⁾ Etwa 3 - 7% der Melanompatienten sind durch die Entwicklung eines Zweitmelanoms gefährdet.⁽¹⁶⁾

1.6 Einteilungen des malignen Melanoms

Die malignen Melanome werden nach verschiedenen Kriterien eingeteilt. Am gängigsten sind die histologische Einteilung nach Clark, die sich nach der Eindringtiefe des Melanoms, d.h. Epidermis bis Subkutis, orientiert und nach Breslow, die die absolute Tumordicke der Primärtumoren unterteilt (siehe Tabelle 1 und 2).⁽⁷⁾ Weitere Stadieneinteilungen erfolgen gemäß der Union International Contre le Cancer (UICC)⁽⁷⁾ (siehe Tabelle 3) bzw. seit 2001 auf Empfehlung des American Joint Committee on Cancer (AJCC)⁽¹⁷⁾ (siehe Tabelle 4 und 5).

Tabelle 1 Tumoreindringtiefe nach Clark⁽⁷⁾

Level I:	Tumorzellen ausschließlich in der Epidermis
Level II:	Tumorzellen durch Basalmembran bis in das Stratum papillare
Level III:	Tumorzellen im oberen Korium (gesamtes Stratum papillare) bis zur Grenzzone vom Stratum reticulare
Level IV:	Tumorzellen im mittleren und unteren Korium
Level V:	Tumorzellen im subkutanen Fettgewebe

Level I – V = Tumoreindringtiefe in verschiedene Hautschichten (Epidermis - Subkutis)

Tabelle 2 Tumordicke des Primärtumors nach Breslow⁽⁷⁾

pT1	Tumordicke bis 0,75 mm
pT2	Tumordicke 0,76 - 1,5 mm
pT3	Tumordicke 1,51 - 4,0 mm
pT4	Tumordicke > 4,0 mm
pTa	Satelliten-Metastasen innerhalb von 2 cm vom Primärtumor (bzw. Lokalrezidiv nach Entfernung mit Sicherheitsabstand)
pTb	In-Transit-Metastasen vor der regionären Lymphknotenstation

pT = Primärtumor

Tabelle 3 Klinische Stadieneinteilung nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer)⁽⁷⁾

Stadium	TNM-Klassifikation			10-Jahres-Überlebensrate
Ia	pT1 (bis 0,75 mm)	N0	M0	97%
Ib	pT2 (0,76 - 1,5 mm)	N0	M0	90%
IIa	pT3 (1,5 - 4 mm)	N0	M0	67%
IIb	pT4 (> 4 mm)	N0	M0	43%
IIIa	pTa*, pTb**	N0	M0	28%
IIIb	jedes pT	N1, N2	M0	19%
IV	jedes pT	jedes N	M1a, b	3%

pT = Primärtumor (Einteilung siehe Tabelle 2),

N = Regionäre Lymphknotenmetastasen (N0: keine, N1: Metastase(n) 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung in irgendeinem Lymphknoten, N2: Metastase(n) mehr als 3 cm in größter Ausdehnung in irgendeinem regionären Lymphknoten und/oder In-Transit-Metastasen)

M = Fernmetastasen (M0: keine, M1a: Befall von Haut, Subkutis oder ferne Lymphknoten, M1b: viszerale Metastasen)

* = Satelliten-Metastasen innerhalb von 2 cm vom Primärtumor (bzw. Lokalrezidiv nach Entfernung mit Sicherheitsabstand)

** = In-Transit-Metastasen vor der regionären Lymphknotenstation

Tabelle 4 TNM-Klassifikation nach AJCC 2001 (American Joint Committee on Cancer)⁽¹⁷⁾

T Klassifikation	Primärtumordicke	Ulzerationsstatus
T1	$\leq 1,0$ mm	a: ohne Ulzeration und Level II - III b: mit Ulzeration oder Level IV - V
T2	1,01 - 2,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01 - 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	$> 4,0$ mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
N Klassifikation	Zahl metastatisch befallener Lymphknoten (LK)	Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung
N1	1 LK	a: Mikrometastasierung b: Makrometastasierung
N2	2 - 3 LK	a: Mikrometastasierung b: Makrometastasierung c: Satelliten- o. In-Transit Metastasen
N3	≥ 4 LK	Satelliten- o. In-Transit Metastasen
M Klassifikation	Ort der Fernmetastasierung	Serumwerte der Laktatdehydrogenase (LDH)
M1a	Haut, Subkutangewebe oder Lymphknoten	Normal
M1b	Lunge	Normal
M1c	Alle anderen Viszeralorgane Jede Art von Fernmetastasierung	Normal Erhöht

T = Primärtumor

N = Regionäre Lymphknotenmetastasen

M = Fernmetastasen

Tabelle 5 Klinische Stadieneinteilung nach AJCC 2001 (American Joint Committee on Cancer)⁽¹⁷⁾

Stadium	TNM-Klassifikation			10-Jahres-Überlebensrate
0	Tis	N0	M0	Keine Angabe
Ia	T1a (bis 1 mm, keine Ulzeration)	N0	M0	87,9%
Ib	T1b (bis 1 mm mit Ulzeration oder Clark Level IV oder V)	N0	M0	83,1%
	T2a (1,02 - 2,0 mm, keine Ulzeration)	N0	M0	79,2%
IIa	T2b (1,02 - 2,0 mm, mit Ulzeration)	N0	M0	64,4%
	T3a (2,01 - 4,0 mm, keine Ulzeration)	N0	M0	63,8%
IIb	T3b (2,01 - 4,0 mm, mit Ulzeration)	N0	M0	50,8%
	T4a (> 4,0 mm, keine Ulzeration)	N0	M0	53,9%
IIc	T4b (> 4,0 mm mit Ulzeration)	N0	M0	32,3%
IIIa	jedes T (keine Ulzeration)	N1a	M0	63,0%
	jedes T (keine Ulzeration)	N2a	M0	56,9%
IIIb	jedes T (mit Ulzeration)	N1a	M0	37,8%
	jedes T (mit Ulzeration)	N2a	M0	35,9%
	jedes T (keine Ulzeration)	N2b	M0	47,7%
IIIc	jedes T (mit Ulzeration)	N1b	M0	24,4%
	jedes T (mit Ulzeration)	N2b	M0	15,0%
	jedes T (mit oder ohne Ulzeration)	N3	M0	18,4%
IV	jedes T (mit oder ohne Ulzeration)	jedes N	M1a	15,7%
	jedes T (mit oder ohne Ulzeration)	jedes N	M1b	2,5%
	jedes T (mit oder ohne Ulzeration)	jedes N	M1c	6,0%

Tis = In situ Tumoren

T = Primärtumor (Einteilung siehe Tabelle 4)

N = Regionale Lymphknotenmetastasen (N0 = keine, N1a = 1 Mikrometastase, N2a = 2 - 3 Mikrometastasen, N1b = 1 Makrometastase, N2b = 2 - 3 Makrometastasen, N3 = 4 Mikro- / Makrometastasen)

M = Fernmetastasen (M0 = keine, M1a = Metastasen in Haut und / oder Subkutis, M1b = Lungenmetastasen, M1c = andere viszerale Metastasen)

1.7 Diagnostik

Die Haut ist zur frühzeitigen Diagnosestellung des malignen Melanoms gut geeignet. Nach Betrachtung mit dem freien Auge und der Lupe werden als zusätzliche präoperative diagnostische Verfahren die Dermatoskopie und die Sonographie eingesetzt.⁽³⁾ Die Farb-Doppler-Sonographie wird zur Diagnostik regionaler Lymphknotenmetastasen verwendet.⁽¹⁸⁾

Die eindeutige Diagnosestellung ist jedoch nur durch histologische Aufarbeitung möglich. Die intraoperative Gefrierschnitt-Technik als Schnellschnittuntersuchung ist dabei bei geplanter großzügiger Exzision eines klinisch nicht sicher klassifizierbaren Pigmenttumors indiziert.⁽¹⁹⁾

Neben diesen Verfahren gehört zur genauen differentialdiagnostischen Abgrenzung die Anfertigung von Paraffin-Präparaten zur histologischen Diagnostik. Einen wichtigen Fortschritt stellt dabei die Anwendung der immunhistochemischen Technik dar, mit welcher in der vorliegenden Arbeit ausschließlich gearbeitet wurde. Die Immunhistochemie ermöglicht es, Proteine, wie z.B. Antigene, im Gewebeschnitt zu lokalisieren und nach erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion diese durch eine Farbreaktion nachzuweisen und lichtmikroskopisch zu beurteilen.⁽²⁰⁾

Zur Diagnostik von Melanommetastasen stehen außerdem eine Reihe von konventionellen radiologischen und nuklearmedizinischen Verfahren zur Verfügung, zu diesen gehören z.B. Röntgen, Ultraschall, Computertomographie, Szinti- und Immunszintigraphie sowie die Sonographie von Lymphknoten- und Weichteilmetastasen. Weiterhin hat sich als modernes, nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren die Positronenemissionstomographie zur Darstellung der Stoffwechselaktivität und damit proliferativen Aktivität etabliert.⁽³⁾

1.7.1 Immunhistologie

Auf Grund des gelegentlichen Vorkommens histologisch atypischer Melanome muss die Diagnose von primären und metastasierten Melanomen oft immunhistochemisch bestätigt werden. Durch Nutzung monoklonaler Antikörper hat sich die Anzahl der korrekten Diagnosen des malignen Melanoms stark verbessert.⁽²⁰⁾

Melanomzellen tragen ebenso wie andere Zellen verschiedene spezifische Oberflächenantigene. Das erste Melanom-assoziierte Antigen wurde 1991 identifiziert und MAGE-1 genannt.⁽²¹⁾ Als weitere Melanom-assoziierten Antigene wurden z.B. gp 100, Tyrosinase, Melan-A/MART-1 und MAGE-3 gefunden.⁽²¹⁻²⁶⁾ Korrespondierende monoklonale Antikörper zu diesen Antigenen sind: HMB-45 (gp 100), T311 (anti-Tyrosinase), A103 (anti-Melan-A/MART-1), anti-MAGE-1 und anti-MAGE-3.^(22;24;27-30)

Die histopathologische Diagnose der primären Melanome und Melanommetastasen kann für gewöhnlich ohne große Probleme erfolgen. Jedoch erfordern die variable histologische Erscheinung dieses Malignoms und Situationen, in denen undifferenzierte maligne Tumore vorhanden sind, oft die Anwendung immunhistologischer Färbungen, um Melanome genau zu diagnostizieren oder auszuschließen. Die zu diesem Zweck meistgenutzten Antikörper sind HMB-45 und anti-S100.⁽²⁰⁾ Weiterhin kommen die oben genannten Antikörper T311, A103, anti-MAGE-1 und anti-MAGE-3 zur Anwendung.^(28;31;32)

HMB-45

HMB-45 ist ein monoklonaler Antikörper, der für ein mit Prämelanosomen assoziiertes Antigen spezifisch erscheint, nützlich für die Identifizierung von differenzierten melanozytären Tumoren ist und eine hohe Spezifität, aber nur eine Sensitivität von 67 - 93% hat.^(33;34) Ursprünglich wurde HMB-45 als ein Antikörper beschrieben, der spezifisch für Melanome und häufige junctionale melanozytäre Nävi ist.^(35;36) Nachfolgend wurde gezeigt, dass er auch mit anderen melanozytären Nävi reagiert, wie z.B. dysplastische, Spindelzell-, Epitheloidzell-, kongenitale und blaue Nävi.^(37;38) HMB-45 wird zur Differenzierung zwischen Melanomen und nicht-melanozytären Neoplasmen in der Routinediagnostik genutzt.⁽³⁹⁾ Bei Metastasen werden oft falsch-negative Ergebnisse erzielt. Diese Metastasen entziehen sich somit der Diagnostik durch den Antikörper HMB-45. Die Diagnose muss daher durch mehrere Antikörper gestützt werden oder es muss ein neuer hochwertigerer Antikörper gefunden werden.^(33;34)

anti-S100

Das S100-Protein wird durch den Antikörper anti-S100 erkannt, welcher sehr sensitiv gegenüber Melanomen ist. Es konnte eine Immunreaktivität dieses Antikörpers von 83 - 100% in unterschiedlichen Studien beobachtet werden.⁽⁴⁰⁻⁴³⁾ Trotz der hohen Sensitivität dieses Antikörpers mangelt es diesem an Spezifität, weshalb sein Wert begrenzt ist. Er markiert viele benigne Zellen wie z.B. Speichel- und Schweißdrüsen, Skelett- und Herzmuskelzellen,

Histiozyten, Schwann-Zellen, Lipozyten, Chondrozyten, Astrozyten, Oligodendrozyten⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ bzw. Tumore, die aus diesen Zellen entstehen^(46;47) sowie verschiedene Tumorgewebe anderer histogenetischer Arten.⁽⁴⁸⁾

A103 (anti-Melan-A/MART-1)

A103 ist ein monoklonaler Antikörper mit einer variierenden Sensitivität von 75 - 100% gegenüber Melanomen, welcher das Antigen Melan-A/MART-1 erkennt.^(28;49;50) Bei immunhistochemischen Färbungen mit diesem Antikörper werden sowohl normale Melanozyten und Nävi als auch maligne melanozytäre Zellen markiert.⁽⁵¹⁾ Zudem werden von A103 unter anderem auch adrenokortikale Karzinome, Leydigzelltumoren und Angiomyolipome gefärbt, so dass dieser Marker nicht spezifisch für das Melanom und nicht für die Differenzierung von melanozytären und nicht-melanozytären Neoplasmen geeignet ist.⁽⁵²⁾ Bei Melanommetastasen wurde eine Immunreaktivität von 78 - 81% für A103 beobachtet.⁽⁴⁹⁾

T311 (anti-Tyrosinase)

Tyrosinase, ein von dem monoklonalen anti-Tyrosinase Antikörper T311 erkanntes Antigen, ist ein Schlüsselenzym in der Melaninsynthese. Mit diesem relativ neuen Antikörper wurde ein weiterer spezifischer und sensitiver Marker zur Diagnosestellung melanozytärer Läsionen entdeckt.^(24;31) Er hat für Nävi eine Sensitivität von 100% und für maligne Melanome besitzt er eine vom klinischen Stadium abhängende Sensitivität von 94%. In den klinischen Stadien I und II nach Clark ist diese noch 100%, wohingegen sie in den Stadien III und IV nur 86% beträgt.⁽⁵³⁾ Hierdurch kommt es zu einem gewissen Anteil an falsch-negativen Untersuchungsergebnissen für Melanommetastasen.

anti-MAGE-1 und anti-MAGE-3

Studien zur Familie der codierenden Melanomantigene MAGE-1 und MAGE-3 zeigten eine fehlende Expression bei Nävi.^(54;55) Bei Untersuchungen an Melanomen wurde für das Antigen MAGE-1 eine Antigenexpression von 75% und für das Antigen MAGE-3 von 44% beobachtet.^(55;56) Für die Differenzierung zwischen benignen und malignen melanozytären Läsionen ist somit die Untersuchung der Antigenexpression von MAGE-1 und MAGE-3 sehr hilfreich.^(55;56)

2. Fragestellung

Für die Melanomdiagnostik wäre es optimal, wenn ein ausschließlich für Melanomzellen spezifischer Antikörper zur Verfügung stünde. Mit Hilfe eines subtraktiven Immunisierungsprotokolls ist es in Vorarbeiten gelungen, den monoklonalen Antikörper SM5-1 von einer humanen Melanom-Zell-Linie einer Lymphknotenmetastase zu gewinnen (Kooperationspartner Prof. YJ. Guo, Cleveland, USA). Vor dem Hintergrund, dass die bisher in der immunhistologischen Routine der Melanomdiagnostik verwendeten Antikörper anti-S100 und HMB-45 Defizite hinsichtlich Spezifität und Sensitivität aufweisen und dadurch einige Metastasen der sicheren Diagnostik mit Hilfe der Immunhistologie entgehen, sollte der neue monoklonale Antikörper SM5-1 untersucht und charakterisiert werden.

Zur Analyse der Immunreaktivität des Antikörpers SM5-1 wurden an unterschiedlichen normalen humanen Geweben, Nävi, nicht-melanozytären Tumoren sowie zwei Melanomstichproben unterschiedlicher Größe eine Reihe von Experimenten durchgeführt. Stichprobe I umfasst 250 primäre und 151 metastasierte Melanome und Stichprobe II beinhaltet 101 primäre sowie 243 metastasierte Melanome, so dass insgesamt 745 Melanomproben untersucht wurden.

Im Rahmen der immunhistochemischen Charakterisierung des Antikörpers SM5-1 sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Wie sieht das Färbespektrum des Antikörpers SM5-1 aus? Ist er spezifisch für Melanome oder färbt er auch andere Gewebe wie Nävi, nicht-melanozytäre Neoplasien und normale Gewebe?
- b) Wie hoch ist die Sensitivität des Antikörpers SM5-1 bei primären und metastasierten Melanomen? Wie verhält sich diese im Vergleich mit den in der Diagnostik häufig verwendeten Antikörpern anti-S100 und HMB-45?
- c) Wie verhält sich die Antigenexpression des Antikörpers SM5-1 an primären Melanomen und dessen Metastasen im Vergleich zur Expression von Melan-A/MART-1 und Tyrosinase?
- d) Welchen Wert hat der Antikörper SM5-1 für die Melanommetastasendiagnostik? Erkennt dieser Antikörper Metastasen, welche für die gebräuchlichen Antikörper negativ sind?

- e) Wie sieht das Färbeverhalten des monoklonalen Antikörpers SM5-1 innerhalb einer Tumorzellpopulation aus? Werden von ihm alle Tumorzellen erkannt bzw. welcher Prozentsatz wird markiert? Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede gibt es in der Expression von SM5-1 mit der von Melan-A/MART-1 bzw. von Tyrosinase?
- f) Wie sind die Färbeintensitäten von SM5-1 an primären und metastasierten Melanomen im Vergleich zu Melan-A/MART-1 und Tyrosinase?
- g) Gibt es einen konkordanten Verlust mehrerer Antigene bei primären und metastasierten Melanomen?

3. Material und Methoden

3.1 Gewebeproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe stammten überwiegend aus zufällig entnommenen Proben der Gewebebank der Dermatologischen Klinik bzw. Präparaten des Pathologischen Instituts der Charité. Die Gewebeproben wurden jeweils nach der Entnahme in 10%igem gepufferten Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Routinebearbeitung durch das histologische Labor und histologischer Diagnostik durch einen Dermatohistopathologen konnte auf die Paraffinblöcke zurückgegriffen werden.

3.2 Gewebearten

Zu den 745 Präparaten von humanen Melanomen gehörten 351 primäre Melanome und 394 Metastasen. Letztere waren hauptsächlich kutane, subkutane und Lymphknotenläsionen. Es wurden aber auch Metastasen der Leber, des Ösophagus, der Lunge, des Knochens, des Magens, der Nieren, der Nebennieren, des Hirns und der Meningen mit einbezogen. Desmoplastische Melanome wurden nicht untersucht. Teilweise stammten die Proben von Patienten mit mehreren primären Melanomen bzw. Metastasen. In solchen Fällen wurden alle zur Verfügung stehenden Läsionen untersucht. Die nicht vom Melanom stammenden melanozytären Läsionen waren 16 Nävi unterschiedlichen histologischen Typs (siehe unter 4.2 Tabelle 8). Des Weiteren wurden verschiedene nicht-melanozytäre Tumore, wie z.B. Basalzellkarzinome, Astrozytome, Ösophaguskarzinome, ein Bronchialkarzinom (siehe unter 4.3 Tabelle 9) und benigne Gewebe, wie z.B. Melanozyten, Keratinozyten, Plasmazellen, Myofibroblasten (siehe unter 4.1 Tabelle 7) untersucht.

3.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Von den in Formaldehyd fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden mit Hilfe des Mikrotoms ca. 3 - 5 µm dicke Schnitte angefertigt, welche zur "Entfaltung" zunächst kurz (max. 1 - 2 min) in ein 40 °C warmes Wasserbad und anschließend auf ChemMate™-

Objektträger gebracht wurden. Nach etwa 12 - 24 Stunden Lufttrocknung bei Raumtemperatur oder Trocknung bei 37 °C in einem Inkubator war die Weiterverarbeitung möglich.

3.4 Entparaffinierung und Gewebevorbehandlung

Vor dem Färbevorgang ist die vollständige Entfernung des Einbettungsmediums zur Vermeidung von Hintergrundfärbung und Überdeckung positiv gefärbter Zellen außerordentlich wichtig.⁽⁵⁷⁾ Mittels der Entparaffinierungsmaschine "Omnibus" des Herstellers Quartett wurden folgende Schritte durchlaufen:

- 2 x 10 min Xylol
- 10 min absolutes Ethanol
- 10 min Ethanol (200 ml) mit 20 ml 3%igem H₂O₂
- 5 - 10 min fließendes Leitungswasser
- 5 - 10 min Tris-Waschpuffer

- Waschpuffer = 0,5 M Tris-Puffer, pH 7,6:

6,1 g Tris (Tris hydroxymethyl aminomethan) in 50 ml Aqua dest. lösen und 37 ml 1 N (HCl) hinzufügen. Aqua dest. ad 1 l. Der pH-Wert muß bei 25 °C 7,6 betragen. Gebrauchswaschlösung: 50 ml Stammlösung auf 450 ml 0,9%ige NaCl-Lösung

Von Formaldehyd bzw. auf Formaldehyd basierenden Lösungen ist bekannt, dass in Antigenen sterische Veränderungen, sogenannte Molekülvernetzungen, induziert bzw. insbesondere Zelloberflächenantigene denaturiert werden können. Durch eine Vorbehandlung mit proteolytischen Enzymen kann versucht werden, überschüssige Aldehydvernetzungen aufzuspalten und die verdeckten Antigene freizulegen.⁽⁵⁷⁾ Das hierfür am häufigsten verwendete Enzym ist Trypsin.⁽⁵⁷⁾

Vorbehandlung für das Färben mit SM5-1:

- 0,05%iges Trypsin in EDTA-Lösung,
- je 100 µl auf Gewebeschnitte geben
- 15 min bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubieren

Eine weitere Vorbehandlung zur Antigenaufdeckung und somit zur Verbesserung und Optimierung der Färbeergebnisse besteht im Erhitzen der Proben in einer Mikrowelle.⁽⁵⁸⁾ Während dieser Mikrowellenbehandlung befanden sich die Proben in Citratpuffer (pH 6,0). Für SM5-1 zeigte sich eine optimale Antigenaufdeckung nach 6,5 Minuten bei 530 Watt. Bei A103 (anti-Melan-A/MART-1), T311 (anti-Tyrosinase), HMB-45 und anti-S100 genügte eine Hitzeeinwirkung von 5 Minuten. Nach mindestens 20minütigem Abkühlen bei Zimmertemperatur und 5 Minuten Waschen der Präparate in Tris-Puffer konnte mit dem Färben begonnen werden. Alle Präparate wurden in dieser Weise vorbehandelt.

3.5 Generierung des Antikörpers SM5-1

Der Antikörper SM5-1 stammte aus einer Reihe von Antikörpern, welche aus einem subtraktiven Immunisierungsprotokoll in Vorarbeiten gewonnen wurden. Zwei humane Melanom-Zell-Linien wurden von einem Patienten etabliert. Dabei stammte eine dieser Zell-Linien (SMMU-1) vom Primärtumor, die andere von Zellen einer Lymphknotenmetastase desselben Patienten (SMMU-2). SMMU-2 metastasierte, wenn man sie subkutan in immundefiziente SCID-Mäuse injizierte, während SMMU-1 dies nicht tat. Da beide Zell-Linien vom selben Patienten gewonnen wurden, konnte ein subtraktives Immunisierungsprotokoll zur Antikörpergewinnung genutzt werden.⁽⁵⁹⁾ Die gewonnenen Antikörper erkannten spezifisch Antigene, die von SMMU-2, nicht aber von SMMU-1 exprimiert wurden. Dabei wurde Mäusen zunächst SMMU-1 injiziert, um SMMU-1-spezifische B-Lymphozyten zu stimulieren. Diese Mäuse wurden dann mit Cyclophosphamid behandelt, um aktivierte und sich teilende Lymphozyten zu eliminieren. Nach Eliminierung der von SMMU-1 aktivierten Lymphozyten wurden die Mäuse wiederholt mit SMMU-2 immunisiert, um spezifische anti-SMMU-2 Antikörper-produzierende B-Lymphozyten zu induzieren. Milzzellen von diesen immunisierten Mäusen wurden mit SP/20-Zellen in einem standardisierten Fusionsprotokoll fusioniert⁽⁶⁰⁾ und SMMU-2 spezifische monoklonale Antikörper mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz sowie FACS-Analysen

identifiziert (jeweils Kooperationspartner Prof. YJ. Guo, Cleveland, USA). Wie zu erwarten, reagierten die monoklonalen Antikörper nur mit SMMU-2, aber nicht mit SMMU-1.

Durch o.g. Hybridisierungsmodell wurden mehrere monoklonale Antikörper gewonnen. Nach Voruntersuchungen der verschiedenen erhaltenen Antikörper wurde der Antikörper SM5-1 (Maus IgG1) wegen seiner Reaktivität bei einer kleinen Stichprobe für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Die vorliegende Arbeit zeigt das immunhistochemische Verhalten des monoklonalen Antikörpers SM5-1 im Vergleich zu den in der Routinediagnostik häufig eingesetzten Markern anti-S100, HMB-45, A103 und T311.

3.6 Verwendete Antikörper

Zum Vergleich der Heterogenität bzw. der Homogenität der in der Melanomdiagnostik gebräuchlichen Antikörper mit SM5-1 wurden die in Tabelle 6 gelisteten Antikörper verwendet. Zur Beurteilung des Färbeverhaltens wurden alle getesteten Tumorgewebe auch mit den zur Zeit in der Routine eingesetzten Markern HMB-45 und anti-S100 kontrollierend gefärbt.

Tabelle 6 Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Herkunft	Konzentration/ Verdünnung
SM5-1	SM5-1	Labor Prof. YJ. Guo, Cleveland, USA	2 µg/ml (gereinigtes IgG1)
anti-Melan-A/ MART-1	A103	Novocastra Laboratories Ltd.; Newcastle, UK	1:50
anti-Tyrosinase	T311	Novocastra Laboratories Ltd.; Newcastle, UK	1:20
HMB-45	HMB-45	DAKO Corporation, Carpinteria, USA	1:50
anti-S100	S1/61/69	Novocastra Laboratories Ltd.; Newcastle, UK	1:20

3.7 Immunhistochemisches Färben

Immunhistochemische Färbetechniken erlauben die Sichtbarmachung von Gewebe- bzw. Zellantigenen. Ursprünglich bediente man sich der direkten Technik, bei der Antikörper mit definierten Antigenspezifitäten eingesetzt wurden, an welche Enzyme direkt gekoppelt waren. Mit Einführung der indirekten Methode verbesserte sich die Sensitivität signifikant. In dieser Zweistufenmethode reagierten mehrere enzymmarkierte Sekundärantikörper mit dem antigengebundenen Primärantikörper.⁽⁵⁷⁾ Später wurde die Peroxidase-Antiperoxidase- (PAP) Methode eingeführt, bei der in drei Stufen der Primärantikörper, der Brückenantikörper und ein Peroxidase-Antiperoxidasekomplex hintereinander eingesetzt wurden.⁽⁶¹⁾ Schließlich wurde von Hsu und Mitarbeitern die Dreistufen-Avidin-Biotinkomplexmethode entwickelt. Diese bedeutete eine weitere Steigerung der Sensitivität gegenüber den bestehenden Methoden.⁽⁶²⁾

3.7.1 Avidin/Streptavidin-Biotin-Methode

Die Avidin/Streptavidin-Biotin-Methode nutzt die starke Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) bzw. Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) für das Vitamin Biotin zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin/Streptavidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundärantikörpern (ABC/SABC-Methode) bzw. zur Kopplung enzymmarkierten Avidins/Streptavidins an biotinylierte Sekundärantikörper (LAB/LSAB-Methode) (siehe Abb. 1a, b).⁽⁵⁷⁾ Die LSAB-Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet. Als Enzym wird häufig Meerrettichperoxidase eingesetzt. Die Durchführung beinhaltet die Applikation eines Primärantikörpers, eines biotinylierten Brückenantikörpers und des Peroxidase-konjugierten Streptavidins. Zur Sichtbarmachung wird eine Substrat-Chromogenlösung verwendet, wobei an der Stelle des gesuchten Antigens ein Präzipitat entsteht.⁽⁵⁷⁾

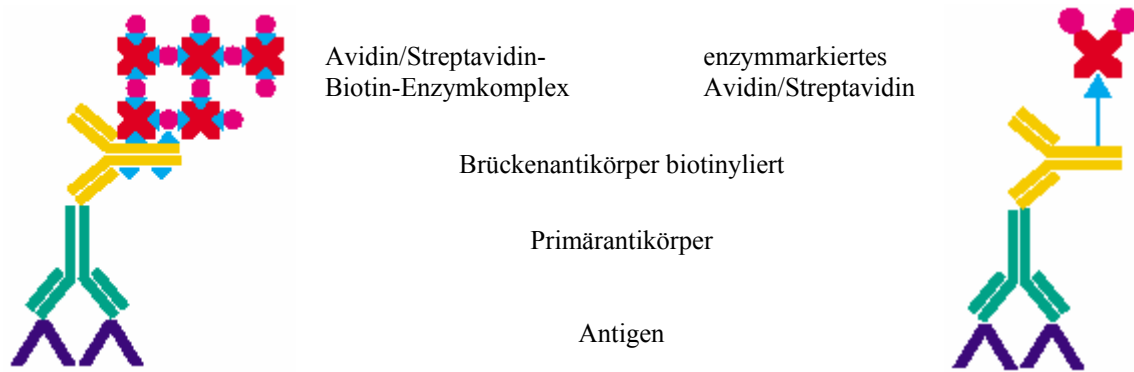


Abb. 1a

Bei der ABC/SABC-Methode reagiert der Avidin/Streptavidin-Biotin-Komplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper.⁽⁵⁷⁾

Abb.1b

Bei der LAB/LSAB-Methode reagiert enzymmarkiertes Avidin/Streptavidin mit dem biotinylierten Sekundärantikörper.⁽⁵⁷⁾

3.7.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Verwendet wurde das Large Volume DAKO LSAB 2 Kit, Peroxidase Code Nr. K 675 sowie das AEC-Substrat-Kit Code Nr. K 696.

Vorbereitungen:

- Vorbehandlung der Schnitte (siehe 3.4).
- Verdünnung der monoklonalen Primärantikörper mit Verdünnungsmedium (DAKO, Code S3022) (siehe 3.6).

Das immunchemische Färben der Gewebeschnitte erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Objektträger 5 min in ein Pufferbad stellen, anschließend sorgfältig abtupfen (zusätzlicher Verdünnungseffekt).
2. Sorgfältiges Überschichten der Gewebeschnitte mit je 100 µl des nach Bedarf verdünnten Primärantikörpers und 50 - 60 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubieren.
Anmerkung: Ein Austrocknen der Gewebeschnitte muss während des Färbeproganges unbedingt verhindert werden.
3. Objektträger 5 min in das Waschpufferbad stellen, anschließend gut abtupfen.

4. Bedecken der Gewebeschnitte mit je etwa 2 Tropfen des Brückenantikörpers (Anti-Maus-IgG, gelbe Flasche), 10 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren, abspülen im Waschpuffer.
5. Objektträger 5 min waschen und dann abtupfen.
6. Bedecken der Gewebeschnitte mit etwa 2 Tropfen des Streptavidin-Peroxidase-Konjugates (rote Flasche), 10 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren, abspülen im Waschpuffer.
7. Objektträger 5 min waschen und abtupfen.
8. Gewebeschnitte mit je 100 µl Substrat-Chromogen bedecken und 10 - 30 min in der feuchten Kammer inkubieren. Anschließend im Waschpuffer abspülen.
 - Substrat-Chromogen = auf 2 ml Substrat-Puffer wird 1 Tropfen AEC-Chromogen (3-amino-9-ethylcabazol) gegeben.
 - direkt vor dem Gebrauch ansetzen, da es nur ca. eine Stunde haltbar ist.
9. Objektträger 5 min waschen und abtupfen.
10. Gegenfärben der Präparate in Mayers Hämatoxylin für 1,5 min (Stoppuhr), anschließend 5 min im Waschpuffer „bläuen“.
11. Objektträger 10 min unter fließendem Leitungswasser abspülen.
12. Lufttrocknen der Präparate.
13. Eindecken der Gewebeschnitte mit vorgewärmtem Glycergel DAKO Code Nr. C 563 und Deckgläschen.

3.8 Auswertung der histologischen Schnitte

Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden unabhängig voneinander von zwei Untersuchern bestimmt. Die Färbeintensität wurde subjektiv als 0 (negativ), 1+ (schwach), 2+ (mäßig), 3+ (stark) und 4+ (sehr stark) eingeteilt. Der Prozentsatz der positiven Zellen innerhalb einer Läsion wurde semiquantitativ als 0 (0 - 1%), 1 (2 - 24%), 2 (25 - 50%), 3 (51 - 75%) und 4 (76 - 100%) ermittelt.

3.9 Übersicht verwendeter Materialien und Geräte

AEC-Substrat-System	DAKO Diagnostika, Hamburg
Antikörper-Verdünnungsmedium	DAKO Diagnostika, Hamburg
anti-Melan-A	Novocastra, Newcastle, UK
anti-S100	Novocastra, Newcastle, UK
anti-Tyrosinase	Novocastra, Newcastle, UK
Aqua dest.	eigene Destillationsanlage
Citrat-Puffer-Konzentrat pH 6,0	BIOCYC GmbH & CO. KG, Luckenwalde
Deckgläschen, 24 x 32 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Eppendorf-Röhrchen 1,5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Ethanol, absolutes	J. T. Baker, Mallinckrodt Baker, B. V., Deventer, Niederlande
Feuchte Kammer	Roth, Karlsruhe
Finn-Pipette 1 - 5 ml	Labsystems, Helsinki, Finnland
Glasküvetten	Roth, Karlsruhe
Glycergel-Einschlußmedium	DAKO Diagnostika, Hamburg
Heizplatte Thermolyne nuova II	Dubuque, Iowa, USA
HMB-45	DAKO Corporation, Carpinteria, USA
Inkubator	DDR
Konzentrierte Salzsäure	Krankenhaus-Apotheke Charité, Berlin
Kühlschrank Liebherr Typ 2007 1	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank Siemens SC Sika frost Comfort	Siemens, Berlin
Küvetten-Mikrowellenbehandlung	DAKO Diagnostika, Hamburg
Leitungswasser	
Lichtmikroskop	Jenalab, DDR
LSAB-Kit, Peroxidase	DAKO Diagnostika, Hamburg
Mayers Hämatoxylin	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Mikrowelle Micromat 110/120	AEG, Nürnberg
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Omnibus Midas E	Quartett, DDR
Phosphatgepufferte Salzsäure (PBS)	Krankenhaus-Apotheke Charité, Berlin
Physiologische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Präparatemappen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schlittenmikrotom	Jung, Heidelberg
SM5-1	Prof. YJ. Guo, Cleveland, USA
Stoppuhr	Roth, Karlsruhe
Tris-gepuffertes Kochsalz-Konzentrat	BIOCYC GmbH & Co. KG, Luckenwalde
Trypsin-EDTA	Merck, Darmstadt
Wasserbad	Leica, Wetzlar
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylol	J. T. Baker, Mallinckrodt Baker, B. V., Deventer, Niederlande
Zellstoff	Krankenhaus-Apotheke Charité, Berlin

4. Ergebnisse

Es wurden unterschiedliche normale Gewebe, Nävi, nicht-melanozytäre Tumore sowie zwei Melanomstichproben unterschiedlicher Größe auf ihre Immunreaktivität mit dem Antikörper SM5-1 untersucht. Melanomstichprobe I umfasste mit 250 primären Melanomen und 151 Melanommetastasen insgesamt 401 Proben. Melanomstichprobe II bestand aus 344 Proben, welche sich in 101 Primärtumore und 243 Metastasen aufteilte. Bei Stichprobe I wurde die Reaktivität des Antikörpers SM5-1 mit HMB-45 und anti-S100 und bei Stichprobe II mit A103 und T311 verglichen.

In jedem Fall wurde die Diagnose durch erfahrene Dermatohistopathologen gestellt. Neben den Färbeergebnissen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, wurden alle Proben der Stichprobe II auch mit HMB-45 und anti-S100 gefärbt. Dies war besonders hilfreich bei negativen Fällen für einen oder mehrere der untersuchten Antikörper.

4.1 Die Expression des durch SM5-1 erkannten Antigens in der Haut und anderen normalen humanen Geweben

Normale Haut, einschließlich der Tumorerläsionen anliegenden Haut, wurde von SM5-1 nicht gefärbt. Von speziellem Interesse war die Negativität von normalen und aktivierten Melanozyten, Keratinozyten, und Langerhanszellen. Die meisten anderen normalen Zellen waren ebenfalls negativ für SM5-1. Eine Färbung zeigte sich lediglich bei einigen Ausnahmen wie Plasmazellen, einigen Myofibroblasten und perivaskulären dendritischen Zellen, Sekreten der ekkrinen Drüsen und Schweißdrüsen und der Prostata sowie sezernierendem Epithel der Thyroidea und des Larynx (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7 Reaktivität von SM5-1 mit normalem humanem Gewebe

Gewebeart / Zellart	Immunhistochemische Färbungen mit SM5-1
Normale Melanozyten	---
Aktivierte Melanozyten	---
Keratinocyten	---
Langerhanszellen	---
Neutrophile Granulozyten	---
Glatte Muskelzellen	---
Keloid	---
Periphere Nerven	---
Talgdrüsen	---
Glomerulum	---
Ziliarepithel	---
Becherzellen	---
Mammagewebe	---
Epididymis	---
Ependym	---
Urothel	---
Lebergewebe	---
Mukosa des Magens	---
Perivaskuläre dendritische Zellen	+
Myofibroblasten	+
Plasmazellen	+
Sekret der ekrinen Schweißdrüsen	+
Sekretionsepithel der Schilddrüse	+
Sekretionsepithel des Larynx	+
Prostatasekret	+
Nierenepithel	+

--- = negativ; + = positiv

4.2 Melanozytäre Nävi

Es wurden an allen untersuchten 16 Nävi (6 Compound, 5 dysplastische, 2 blaue, 3 kombinierte Nävi) starke Färbungen mit SM5-1 beobachtet. Der Antikörper zeigte nur an den Nävuszellen ein homogenes Färbeverhalten, während nicht-aktivierte basale Melanozyten negativ waren. Ein Beispiel wird in Abb. 2a (siehe Seite 30) gezeigt. HMB-45 und anti-S100 reagierten ebenfalls mit allen Nävi (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8 Reaktivität von SM5-1, HMB-45 und anti-S100 mit melanozytären Nävi bei in Paraffin fixierten Proben

Melanozytäre Läsion	Immunhistochemische Färbungen mit		
	SM5-1 (positiv/getestet)	HMB-45 (positiv/getestet)	anti-S100 (positiv/getestet)
NÄVI			
Compound	6/6	6/6	6/6
Dysplastisch	5/5	5/5	5/5
Blau	2/2	2/2	2/2
Kombiniert	3/3	3/3	3/3
Gesamt	16/16 (100%)	16/16 (100%)	16/16 (100%)

4.3 Färbungen durch den Antikörper SM5-1 bei nicht-melanozytären Tumoren

Um die Reaktivität von SM5-1 mit anderen Malignomen als dem Melanom zu untersuchen, wurde eine große Auswahl anderer Tumore auf von SM5-1 erkannte Epitopexpression getestet. Die Gewebe beinhalteten Tumore, die von der Haut, den Nerven, dem Gehirn, dem Gastrointestinaltrakt und anderen stammen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der 40 verschiedenen nicht-melanozytären Tumore sind in Tabelle 9 gezeigt. Keine der in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeproben reagierte mit SM5-1. HMB-45 war für diese Tumore auch in allen Fällen negativ. Für anti-S100 wurden in einigen Gehirntumoren, Nerventumoren, Brustkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, malignen Histiozytosen und Chordomen positive Färbungen gefunden.

Tabelle 9 Reaktivität von SM5-1, HMB-45 und anti-S100 mit nicht-melanozytären Tumoren bei in Paraffin fixierten Proben (n = 84)

Tumore	Immunhistochemische Färbungen mit		
	SM5-1 (positiv/getestet)	HMB-45 (positiv/getestet)	anti-S100 (positiv/getestet)
Haut			
Dermatofibrosarcoma protuberans	0/4	0/4	0/4
Merkelzellkarzinom	0/4	0/4	0/4
Schweißdrüsenkarzinom	0/3	0/3	0/3
Morbus Paget	0/3	0/3	0/3
Basalzellkarzinom	0/2	0/2	0/2
Angioleiomyosarkom	0/2	0/2	0/2
Plattenepithelkarzinom	0/4	0/4	0/4
Gehirn			
Neurinom	0/1	0/1	0/1
Astrozytom	0/4	0/4	4/4
Oligodendrogliom	0/2	0/2	1/2
Meningeom	0/5	0/5	1/5
Glioblastom	0/2	0/2	2/2
Nerven			
Neurinom (peripher)	0/3	0/3	3/3
Neurofibrom	0/2	0/2	2/2
Ganglioneurom	0/1	0/1	1/1
Gastrointestinaltrakt			
Ösophaguskarzinom	0/2	0/2	0/2
Magenkarzinom	0/2	0/2	0/2
Kolonkarzinom	0/3	0/3	0/3
Pankreaskarzinom	0/2	0/2	0/2
Hepatozelluläres Karzinom	0/1	0/1	0/1

Fortsetzung Tabelle 9

Tumore	Immunhistochemische Färbungen mit		
	SM5-1	HMB-45	anti-S100
	(positiv/getestet)	(positiv/getestet)	(positiv/getestet)
Verschiedene			
Schilddrüsenkarzinom	0/2	0/2	1/2
Plattenepithelkarzinom des Pharynx	0/2	0/2	0/2
Bronchialkarzinom	0/1	0/1	0/1
Mammakarzinom	0/3	0/3	3/3
Ovarialkarzinom	0/1	0/1	0/1
Prostatakarzinom	0/2	0/2	0/2
Seminom	0/1	0/1	0/1
Harnblasenkarzinom	0/1	0/1	0/1
Nierenzellkarzinom	0/2	0/2	0/2
Leiomyosarkom	0/2	0/2	0/2
Angiomyosarkom	0/3	0/3	0/3
Porokarzinom	0/1	0/1	0/1
Osteosarkom	0/2	0/2	0/2
Mesotheliom	0/1	0/1	0/1
Maligne Histiozytose	0/3	0/3	2/3
Immunozytom	0/1	0/1	0/1
Malignes fibröses Histiozytom	0/1	0/1	0/1
Germinom	0/1	0/1	0/1
Teratom	0/1	0/1	0/1
Chordom	0/1	0/1	1/1
Gesamt	0/84	0/84	21/84

4.4 Immunhistochemisches Färbeverhalten von SM5-1 an primären malignen Melanomen

Die Resultate der immunhistochemischen Analyse der Melanomproben der Stichprobe I sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Von 250 primären Melanomen waren 248 (99%) positiv für SM5-1. Demzufolge war das Färben nicht vom histologischen Typ (oberflächlich spreitend, nodulär, lentigo maligna, akro-lentiginös) oder vom Clark Level abhängig, da alle histologischen Entitäten unter den 250 Primärtumoren vertreten waren. Zwei Beispiele sind in Abb. 2b (Melanoma in situ) und Abb. 2c (noduläres malignes Melanom) gezeigt (Abbildungen siehe Seite 30). Allgemein wurde die Reaktivität von SM5-1 in einer starken membranösen und zytoplasmatischen Verteilung gefunden. Alle untersuchten Gewebeproben wurden auch hier mit anti-S100 und HMB-45 gefärbt und färbten ebenso die weitaus größte Zahl der primären Tumore (HMB-45 99%, anti-S100 97%).

Tabelle 10 Reaktivität von SM5-1, HMB-45 und anti-S100 mit primären Melanomen und Melanommetastasen bei in Paraffin eingebetteten Proben.

Melanom	Immunhistochemische Färbungen mit		
	SM5-1 (positiv/getestet)	HMB-45 (positiv/getestet)	anti-S100 (positiv/getestet)
Primäres Melanom			
in situ	13/13	13/13	13/13
Clark Level II	37/38	38/38	37/38
Clark Level III	88/89	89/89	85/89
Clark Level IV	96/96	94/96	95/96
Clark Level V	14/14	14/14	13/14
Gesamt	248/250 (99%)	248/250 (99%)	243/250 (97%)
Melanommetastasen	146/151 (96%)	126/151 (83%)	146/151 (96%)
Gesamt	394/401 (98%)	374/401 (93%)	389/401 (97%)

4.5 Immunhistochemie des monoklonalen Antikörpers SM5-1 bei Melanommetastasen

In Stichprobe I wurden 151 Metastasen untersucht, welche hauptsächlich kutane, subkutane oder Lymphknotenmetastasen waren. Es waren aber auch 18 Melanommetastasen verschiedener Organe einbezogen. SM5-1 färbte 96% (146/151) (siehe Tabelle 10) dieser Läsionen und zeigte

meistens eine starke und homogene Reaktivität. Ein Beispiel einer Lymphknotenmetastase ist in Abb. 2d (siehe Seite 30) gezeigt. Während anti-S100 einen Prozentsatz von 96% (146/151) an positiven Färbungen zeigte, reagierte HMB-45 nur in 83% (126/151). Alle 25 HMB-45-negativen Melanommetastasen waren positiv für SM5-1. In Fällen fehlender Färbung für HMB-45 war die Färbung für SM5-1 manchmal weniger stark betont, aber dennoch stets auffindbar (siehe Abb. 3, Seite 30). In Fällen, in denen HMB-45 und SM5-1 positiv waren, lagen die Epitope für SM5-1 und HMB-45 an verschiedenen Tumorzellpopulationen innerhalb des Tumors. Im Allgemeinen waren die Färbungen für SM5-1 stark und schlossen die Mehrheit der neoplastischen Zellen ein.

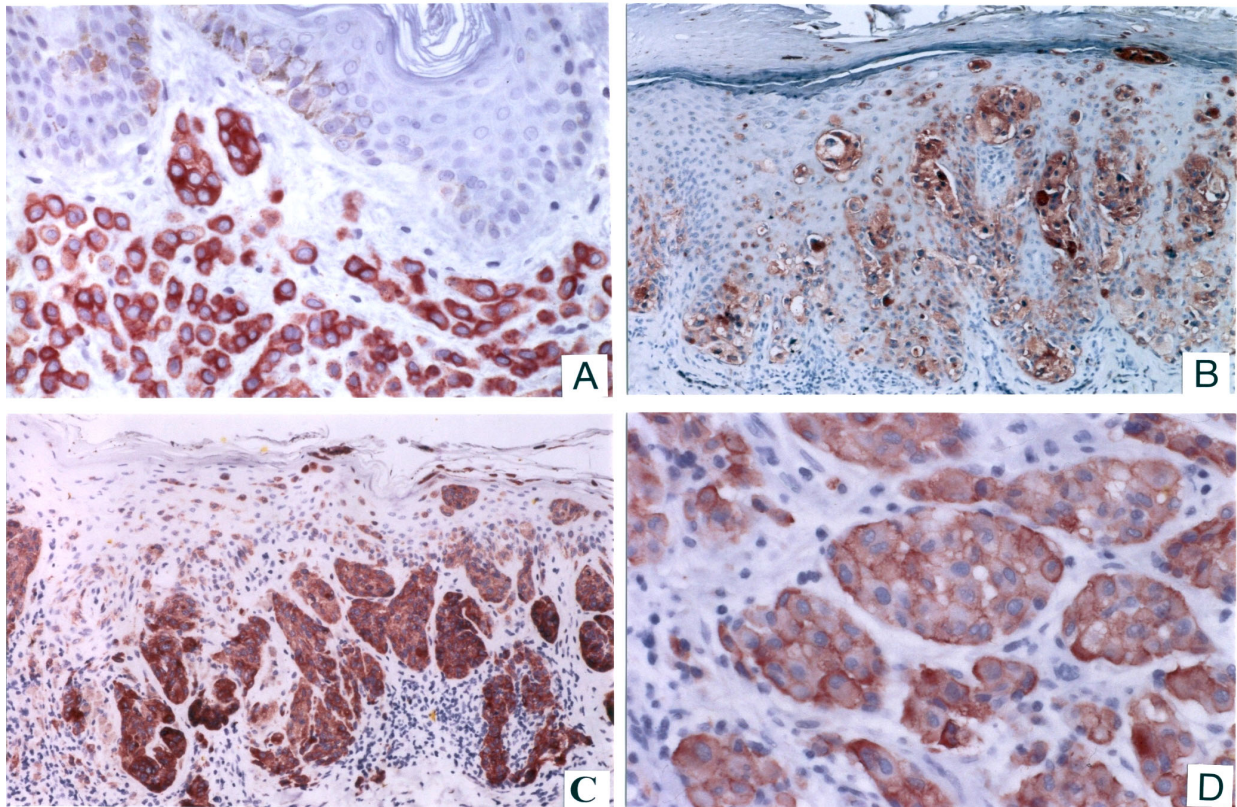


Abb. 2

Immunfärbungen von melanozytären Tumoren mit SM5-1. Beachtenswert ist das homogene Färben der Compoundnävuszellen, während die nicht aktivierten basalen Melanozyten negativ sind (A: Vergr. x200). Bei dem In-situ-Melanom (B: Vergr. x82,5), dem nodulären Melanom (Clark IV, Breslow 2,16 mm; C: Vergr. x92) und der Lymphknotenmetastase eines Melanoms (D: Vergr. x250) reagiert SM5-1 mit der vollständigen Tumorzellpopulation.

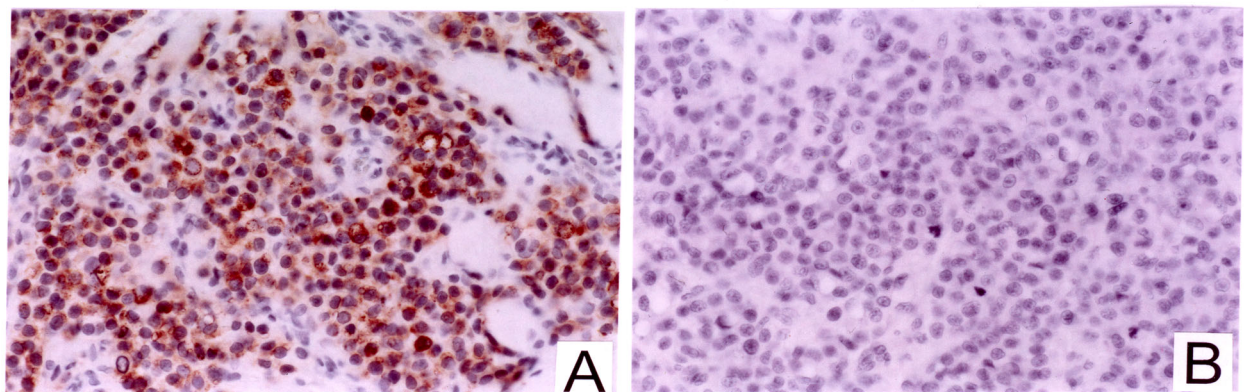


Abb. 3

Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms, immungefärbt mit SM5-1 (A: Vergr. x200) und HMB-45 (B: Vergr. x200). Die Färbung von SM5-1 ist homogen und intensiv, während durch HMB-45 keine Zellen markiert wurden.

4.6 Vergleich der Antigenexpression des Antikörpers SM5-1 in primären Melanomen mit Antikörpern gegen Melan-A/MART-1 (A103) und Tyrosinase (T311)

Im Folgenden wurden Melanomproben aus Stichprobe II mit den Antikörpern SM5-1, A103 und T311 gefärbt und analysiert. Die mittels immunhistochemischer Diagnose erlangten Daten für primäre Melanome sind in Tabelle 11 (oberer Teil) zusammengefasst. 96/101 (95%) der primären Melanome waren positiv für SM5-1. Dementsprechend gab es keine Beeinflussung der Färbung durch den histologischen Typ (superfiziell spreitend, nodulär, lentigo maligna, akrolentiginös) oder den Clark Level. A103 und T311 reagierten bei einer sehr großen Mehrheit der untersuchten Melanomproben mit einer Positivität von 98/101 (97%) und 91/101 (90%).

Tabelle 11 Reaktivität von SM5-1, A103 und T311 beim primären und metastasierten Melanom bei in Paraffin eingebetteten Proben

Melanom	Immunhistochemische Färbungen mit		
	SM5-1 (positiv/getestet)	A103 (positiv/getestet)	T311 (positiv/getestet)
Primäres Melanom (n = 101)			
in situ	10/11	10/11	11/11
Clark Level II	11/12	12/12	12/12
Clark Level III	25/26	26/26	22/26
Clark Level IV	46/48	47/48	45/48
Clark Level V	4/4	3/4	1/4
Gesamt	96/101 (95,0%)	98/101 (97,0%)	91/101 (90,0%)
Melanommetastasen (n = 243)	222/243 (91,3%)	187/243 (76,9%)	154/243 (63,3%)
Gesamt (n = 344)	318/344 (92,4%)	285/344 (82,8%)	245/344 (71,2%)

4.7 Antigenexpression des Antikörpers SM5-1 im Vergleich mit Melan-A/MART-1 und Tyrosinase an Melanommetastasen

Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebe, waren hauptsächlich kutane, subkutane oder Lymphknotenmetastasen, aber beinhalteten auch Metastasen der Lunge, der Speiseröhre, der Niere, der Nebenniere, des Knochens, des Gehirns, der Meningen, und der Mukosa. SM5-1 färbte 91% (222/243) der Läsionen, während A103 in 77% (187/243) und T311 in 63% (154/243) der Fälle positiv waren (siehe Tabelle 11, unterer Teil). Von den 56 für A103 negativen Läsionen konnten 52 korrekt als Melanomläsionen durch SM5-1 Färbungen identifiziert werden. Von den 89 für Tyrosinase negativen Läsionen waren 81 positiv für SM5-1.

4.8 Expression von SM5-1, Melan-A/MART-1 und Tyrosinase bei primären und metastasierten Melanomen

In Tabelle 12 ist die Expression von SM5-1, A103 und T311 als prozentuale Positivität zusammengefasst. Bei den primären Melanomen (n = 101) zeigten 85% der von SM5-1 gefärbten Zellen eine relativ homogene Expression mit Färbungen über 50% der Tumorzellpopulation. Dieses differiert zu A103 und T311, wo nur 68% bzw. 63% der Fälle Färbungen von mehr als 50% der Zellen aufwiesen.

SM5-1 hat im allgemeinen die Läsionen homogener gefärbt. Bei 80% aller Metastasen lag dort eine Positivität von 50% oder mehr vor. A103 und T311 zeigten ein signifikant heterogeneres Färbemuster. Mit nur 58% für A103 bzw. 48% für T311 lag hier der Prozentsatz der mehr als 50% positiv gefärbten Tumorzellen der metastasierten Läsionen. Bei 60% der Läsionen waren mehr als 75% der Zellen für den Antikörper SM5-1 positiv, während bei A103 nur 34% und bei T311 nur 30% positiv für diesen Grad waren. Bei diesen Ergebnissen muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch die negativen Läsionen, welche für A103 und T311 erheblich höher waren, mit in diese Berechnung eingegangen sind. Wenn nur die positiv gefärbten metastasierten Läsionen betrachtet werden, färbte SM5-1 88% der Proben zu mehr als 50%, während A103 und T311 75% bzw. 76% der Proben zu mehr als 50% färbten. Einen Färbegrad von mehr als 75% der Zellen innerhalb einer Läsion wiesen SM5-1 bei 66%, A103 bei 44% und T311 bei 47% auf (siehe Tabelle 12, unterer Teil).

Tabelle 12 Reaktivität von SM5-1, A103 und T311 beim primären und metastasierten Melanom in Prozent der positiven Zellen

Prozentsatz	Immunhistochemische Färbungen mit					
	SM5-1		A103		T311	
Primäres Melanom (n = 101)						
Negativ	5 (5%)		3 (3%)		10 (10%)	
< 25%	3 (3%)		5 (5%)		6 (6%)	
25 - 50%	7 (7%)		24 (24%)		22 (21%)	
51 - 75%	23 (23%)		28 (28%)		24 (24%)	
> 75%	63 (62%)		41 (40%)		39 (39%)	
Melanommetastasen (n = 243)	Alle Läsionen n = 243	Nur positive Läsionen n = 222	Alle Läsionen n = 243	Nur positive Läsionen n = 187	Alle Läsionen n = 243	Nur positive Läsionen n = 154
Negativ	21 (9%)	---	56 (23%)	---	89 (37%)	---
< 25%	9 (4%)	4%	12 (5%)	6%	9 (4%)	6%
25 - 50%	17 (7%)	8%	34 (14%)	18%	28 (11%)	18%
51 - 75%	49 (20%)	22%	58 (24%)	31%	44 (18%)	29%
> 75%	147 (60%)	66%	83 (34%)	44%	73 (30%)	47%

Negativ = 0 - 1% der positiven Zellen innerhalb einer Tumorerläsion

< 25% = 2 - 24% der positiven Zellen innerhalb einer Tumorerläsion

25 - 50% = Prozentsatz der positiven Zellen innerhalb einer Tumorerläsion

51 - 75% = Prozentsatz der positiven Zellen innerhalb einer Tumorerläsion

> 75% = 76 - 100% der positiven Zellen innerhalb einer Tumorerläsion

Der Färbegrad wurde semiquantitativ durch 2 unabhängige Untersucher ermittelt.

4.9 Färbeintensitäten für SM5-1, A103 und T311 bei primären und metastasierten Melanomen

Ein Beispiel für die Analyse der Färbeintensitäten ist in Abb. 2 (siehe Seite 30) gezeigt. Bei vier verschiedenen Melanomproben wurde die Färbeintensität als schwach (A), mäßig (B), stark (C) oder sehr stark (D) eingestuft. Bei den primären Melanomen war die Färbeintensität für alle drei Antikörper etwa gleich (siehe Tabelle 13 oberer Teil). Eine starke oder sehr starke Färbung wurde in 75%, 67% und 68% der Läsionen, die mit SM5-1, A103 und T311 gefärbt wurden, gesehen. Somit zeigte die Mehrzahl der primären Läsionen eine starke Expression der jeweiligen Antigene. Es wurde ein wichtiger Unterschied zwischen den drei Antikörpern bei den Gewebeproben der metastasierten Läsionen gefunden (siehe Tabelle 13, unterer Teil). Ein großer Anteil färbte stark oder sehr stark mit SM5-1 (64%). Bei A103 hingegen war dies nur für 35% und bei T311 nur für 29% so. Somit zeigten 65% der Läsionen bei A103 keine oder nur schwache Färbungen. Dasselbe gilt für T311, welches eine Abwesenheit oder ein schwaches bis mäßiges Färben bei 71% aufzeigte. Im Allgemeinen gab es eine strenge Korrelation zwischen Prozentsatz der Positivität und Färbeintensität bei SM5-1. Von den 58 sehr stark positiven Metastasen hatten 55 auch eine Positivität von mehr als 75% der Zellen. Auch bei T311 korrelierten die Färbeintensität und der Prozentsatz der gefärbten Zellen gut. Von den 23 schwach positiven A103-Läsionen waren nur 16 positiv mit mehr als 75% der Zellen.

Tabelle 13 Färbeintensitäten von SM5-1, A103 und T311 beim primären und metastasierten Melanom

Färbeintensität	Immunhistochemische Färbungen mit		
	SM5-1	A103	T311
Primäres Melanom (n = 101)			
Negativ	5 (5%)	3 (3%)	10 (10%)
1+	4 (4%)	2 (2%)	5 (5%)
2+	16 (16%)	28 (28%)	17 (17%)
3+	42 (41%)	42 (41%)	28 (28%)
4+	34 (34%)	26 (26%)	41 (40%)
Melanommetastasen (n = 243)			
Negativ	21 (9%)	56 (23%)	89 (37%)
1+	20 (8%)	22 (9%)	24 (10%)
2+	47 (19%)	80 (33%)	60 (24%)
3+	97 (40%)	62 (26%)	39 (16%)
4+	58 (24%)	23 (9%)	31 (13%)

Subjektive Einteilung der Färbeintensität mittels Lichtmikroskopie:

Negativ = keine Färbung

1+ = schwache Färbung

2+ = mäßige Färbung

3+ = starke Färbung

4+ = sehr starke Färbung

4.10 Konkordanter Verlust der Antigene für Melan-A/MART-1 und Tyrosinase bei primären oder metastasierten Melanomen

Da die Sensitivität aller Antikörper bei primären Melanomen sehr hoch ist, war der konkordante, d.h. der gleichzeitige Verlust der Antigene sehr unregelmäßig und wurde nur in einem negativen Fall für Melan-A/MART-1 und Tyrosinase beobachtet. Diese Läsion war positiv für SM5-1 (siehe Tabelle 14 oberer Teil). Für Melan-A/MART-1 und Tyrosinase waren 15,6% der Metastasen negativ, während der erwartete Verlust nur 8,4% war. Dieser erwartete Verlust wurde durch Multiplikation der Melan-A/MART-1-Negativität mit der Tyrosinase-Negativität der 243 Läsionen ($0,231 \times 0,367 = 8,4\%$) berechnet. Es waren 38 Metastasen negativ für A103

und T311. Davon waren 35 Proben (92,1%) positiv für SM5-1. Dies demonstriert den Wert von SM5-1 für die Identifizierung negativer Läsionen für melanozytäre Differenzierungsantigene (MDA). Der gleichzeitige Verlust von SM5-1 und Melan-A/MART-1 bzw. SM5-1 und Tyrosinase war innerhalb des erwarteten Grades oder geringfügig geringer (Tabelle 14, unterer Teil). Alle Metastasen wurden auch hier mit HMB-45 und anti-S100 gefärbt, um die richtige Diagnose zu bestätigen.

Tabelle 14 Melanommetastasen mit konkordantem Verlust von zwei oder mehr Antigenen-
durch SM5-1, Melan-A/MART-1 oder Tyrosinase erkannt

Primäre Melanome (n = 101) negativ für			gefunden	erwartet
SM5-1	Melan-A/MART-1		0%	0,15%
SM5-1		Tyrosinase	0%	0,5%
	Melan-A/MART-1	Tyrosinase	0,99% (n = 1)	0,03%
SM5-1	Melan-A/MART-1	Tyrosinase	0%	0,015%
Melanommetastasen (n = 243) negativ für				
SM5-1	Melan-A/MART-1		0,8% (n = 2)	2,0%
SM5-1		Tyrosinase	2,8% (n = 7)	3,1%
	Melan-A/MART-1	Tyrosinase	15,6% (n = 38)	8,4%
SM5-1	Melan-A/MART-1	Tyrosinase	1,2% (n = 3)	0,7%

5. Diskussion

Arbeiten anderer Autoren zeigten, dass die Antikörper anti-S100 und HMB-45, welche hauptsächlich in der immunhistochemischen Melanomdiagnostik Anwendung finden, hinsichtlich Spezifität und Sensitivität Defizite aufweisen. So ist anti-S100 sehr unspezifisch für das Melanom, hat jedoch eine Sensitivität von 83 - 100%.⁽⁴⁰⁻⁴⁵⁾ HMB-45 hingegen hat nur eine Sensitivität von 67 - 93%, ist jedoch für die Unterscheidung zwischen Melanomen und nicht-melanozytären Neoplasmen geeignet.^(33;34;39) Da sich beide Antikörper sehr gut ergänzen, werden sie bei der immunhistochemischen Diagnostik des Melanoms zumeist parallel eingesetzt.⁽⁶³⁾ Außerdem wurde gezeigt, dass sich einige Melanommetastasen der sicheren immunhistochemischen Diagnostik entziehen.^(33;34) Es wäre von Vorteil, wenn es einen Antikörper gäbe, welcher die für die Melanomdiagnostik nutzbaren Eigenschaften von anti-S100 und HMB-45 vereinen und die bestehenden Defizite ausgleichen würde. Der Antikörper SM5-1, der durch ein subtraktives Immunsierungsprotokoll eines humanen Melanommausmodells in Vorarbeiten generiert wurde, könnte den gewünschten Anforderungen entsprechen. Vor diesem Hintergrund wurde SM5-1, dessen Antigen noch näher charakterisiert werden muss, immunhistochemisch untersucht und analysiert. Hierfür wurden verschiedene normale Gewebe, Nävi, nicht-melanozytäre Tumore sowie zwei unterschiedliche Melanomstichproben untersucht. SM5-1 wurde zunächst mit HMB-45 und anti-S100 an 250 primären und 151 metastasierten Melanomen und in einer zweiten Stichprobe mit Melan-A/MART-1 und Tyrosinase an 101 primären und 243 metastasierten Melanomen verglichen.

5.1 Spezifität des Antikörpers SM5-1

Um die Spezifität des Antikörpers SM5-1 für melanozytäre Läsionen beurteilen und sie mit den bekannten Antikörpern HMB-45 und anti-S100 vergleichen zu können, wurden normale Haut, verschiedene normale humane Gewebe, Sekrete und Zellen (siehe 4.1 Tabelle 7) sowie melanozytäre Nävi (siehe 4.2 Tabelle 8) und nicht-melanozytäre Tumore (siehe 4.3 Tabelle 9) mit dem Antikörper SM5-1 immunhistochemisch gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Bei den Untersuchungen der normalen Haut waren das Färbeverhalten von SM5-1 bei normalen und aktivierten Melanozyten, Keratinozyten sowie Langerhanszellen von speziellem Interesse. Diese Zellen waren alle negativ für SM5-1. Nur einige wenige normale Zellen oder Drüsensekrete wurden durch SM5-1 gefärbt (siehe 4.1 Tabelle 7) und sind mit den unspezifischen Färbungen von HMB-45⁽⁶³⁾, jedoch keineswegs mit denen von anti-S100^(44;45) vergleichbar.

Des Weiteren wurden verschiedene Näviarten mit dem Antikörper SM5-1 untersucht (siehe 4.2 Tabelle 8). Es zeigten sich bei allen Proben starke Färbungen für SM5-1. Dabei stellte sich heraus, dass alle 16 untersuchten Nävi stark und homogen an den Nävuszellen gefärbt wurden, basale nicht-aktivierte Melanozyten waren jedoch negativ. Dies ist besonders interessant, da bei den Reaktivitätsuntersuchungen mit normalem humanen Gewebe SM5-1 sowohl für normale Melanozyten als auch für aktivierte Melanozyten negativ war. Durch die positiven Färbungen von SM5-1 bei den untersuchten melanozytären Nävi wurde gezeigt, dass dieser Antikörper nicht spezifisch für Melanome ist. Auch für HMB-45 und anti-S100 ist bekannt, dass sie Nävi färben.^(64;65) Somit ist der Antikörper SM5-1 keinem der beiden anderen Antikörper in diesem Punkt überlegen.

Von den 84 Beispielen der 40 verschiedenen untersuchten nicht-melanozytären Neoplasien (siehe 4.3 Tabelle 9) wurde keine Gewebeprobe mit SM5-1 oder HMB-45 gefärbt. Anti-S100 war hingegen in einigen Tumoren, die vom Hirn, den Nerven, der Schilddrüse und der Brust stammten, positiv. Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine positive Färbung mit anti-S100 nicht auf Zellen von melanozytärer Herkunft beschränkt ist und unterstreichen die schon oft dokumentierte Unspezifität dieses Antikörpers für das Melanom.⁽⁴³⁻⁴⁸⁾ Im Färbeverhalten gegenüber nicht-melanozytären Tumoren entspricht somit der Antikörper SM5-1 dem Antikörper HMB-45. Aus diesen Ergebnissen kann man zunächst schließen, dass SM5-1, ähnlich dem Antikörper HMB-45, eine höhere Spezifität als anti-S100 für melanozytäre Läsionen hat.

5.2 Sensitivität des Antikörpers SM5-1 für primäre und metastasierte Melanome

Um Aussagen über die Sensitivität des Antikörpers SM5-1 für primäre und metastasierte Melanome treffen und diese mit der Immunreaktivität von HMB-45 und anti-S100 vergleichen zu können, wurden 250 primäre Melanome und 151 Melanommetastasen immunhistologisch mit SM5-1, HMB-45 und anti-S100 untersucht (siehe 4.4 Tabelle 10).

Bei den primären malignen Melanomen wurden durch SM5-1 99% der untersuchten Gewebe, unabhängig vom histologischen Typ (superfiziell spreitend, nodulär, lentigo maligna, akrolentiginös) oder vom Clark Level (siehe Abb. 2b und 2c Seite 30) gefärbt. Auch HMB-45 (99%) und anti-S100 (97%) zeigten eine ähnliche Sensitivität. Demzufolge ist der Antikörper SM5-1 bezüglich der Sensitivität gegenüber primären Melanomen mit den Antikörpern HMB-45 und anti-S100 gleichrangig.

Bei Stichprobe I, bestehend aus 151 Melanommetastasen, reagierten 96% zumeist stark und homogen mit SM5-1. Dieses Ergebnis konnte in derselben Stichprobe auch für den Antikörper anti-S100 gefunden werden. Jedoch blieben bei der Antigenaufdeckung durch den Antikörper HMB-45 eine signifikante Anzahl von Metastasen (17%) unerkannt. Diese Beobachtung ist auch aus früheren Untersuchungen bekannt.^(33;34) Hier ergibt sich für SM5-1 ein klarer diagnostischer Vorteil gegenüber HMB-45. Da alle HMB-45-negativen Metastasen positiv für SM5-1 waren, könnte man diesen neuen Antikörper gezielt für die Aufdeckung dieser einsetzen bzw. durch einen generellen Einsatz von SM5-1 bei der immunhistochemischen Diagnose des Melanoms bei den ersten Färbungen eine sicherere Diagnose stellen. So könnte das für HMB-45 bekannte Defizit, dass sich einige Melanommetastasen der immunhistologischen Diagnostik entziehen^(33;34), durch den Antikörper SM5-1 ausgeglichen werden.

Da Melanompatienten ein erheblich erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines sekundären primären Tumors, z.B. Lungenkarzinom⁽⁶⁶⁾ haben, ist es von großer Wichtigkeit jede Läsion oder suspekte parenchymale Läsion bei Melanompatienten zu analysieren und identifizieren. In einer Studie konnte eine zweite pulmonale Neoplasie bei 3 von 50 Melanompatienten durch Nutzung von zwei unterschiedlichen Antikörpern mittels immunzytochemischer Diagnostik identifiziert

werden.⁽⁶⁷⁾ Basierend auf der begrenzten Sensitivität von HMB-45 für richtig erkannte Metastasen fehlt möglicherweise die korrekte Diagnose in solchen Fällen, wenn HMB-45 allein benutzt wird. Die Nutzung von SM5-1 könnte den Gebrauch einer Reihe von Antikörpern in solchen Fällen unnötig machen und möglicherweise ein nützlicher Zusatz in der Diagnostik des humanen Melanoms, insbesondere in der Metastasendiagnostik, sein.

Der Antikörper SM5-1 wurde mittels eines subtraktiven Immunsisierungsprotokolls entwickelt. Interessanterweise ist die Reaktivität für primäre Melanome, für deren Metastasen sowie für Nävi vergleichbar, obwohl die Mäuse zunächst mit Antigenen von primären Melanomen und später dann mit metastasierten Zellen sensibilisiert wurden, um danach Antikörper gegen metastasenassoziierte Antigene zu gewinnen. Wenn auch mit SM5-1 ein wertvoller Antikörper mit diesem Protokoll erzeugt wurde, wurde das ursprüngliche Ziel, der Erzeugung eines Antikörpers gegen metastasenassoziierte Antigene, nicht erreicht. Das Epitop, welches durch SM5-1 erkannt wird, ist nicht auf metastasierte melanozytäre Zellen beschränkt, sondern wird ubiquitär auf melanozytären Läsionen exprimiert. Es unterscheidet sich offenbar von jenem, welches mit HMB-45 reagiert. Dies lässt sich damit begründen, dass HMB-45-negative Metastasen positiv für SM5-1 sind und SM5-1 nicht mit aktivierten Melanozyten reagiert, wie es bei HMB-45 der Fall ist⁽³⁶⁾ (siehe 4.1 Tabelle 7). Außerdem hat HMB-45 ein vorherrschendes zytoplasmatisches Färbemuster, wohingegen SM5-1 das Zytoplasma und die Zellmembran färbt. Ferner reagierte SM5-1 in Vorarbeiten mit einem 200 - 225 kDa großen Molekül im Westernblot, während HMB-45 zwei Banden erkennt, eine bei einer Größe von 10 kDa und eine andere bei 100 kDa.⁽⁶⁸⁾ In weiteren Untersuchungen müssten die genauen Merkmale des Antigens geklärt werden, welches durch SM5-1 erkannt wird. Von speziellem Interesse sollte die Fähigkeit von SM5-1 sein, zuverlässig Metastasen des malignen Melanoms bei Patienten zu erkennen, die schwach differenzierte Tumore tragen.

5.3 Antigenexpression von SM5-1, Melan-A/MART-1 und Tyrosinase in primären und metastasierten Melanomen

Die erst seit wenigen Jahren charakterisierten Antikörper anti-Tyrosinase T311 und A103 mit den jeweils korrespondierenden Antigenen Tyrosinase und Melan-A/MART-1 sind weniger sensitiv als die beiden Antikörper anti-S100 und HMB-45, werden jedoch auch in der immunhistologischen Routinediagnostik des Melanoms eingesetzt.^(24;28;31;49;52;53) In diesem Teil der Arbeit wurde an einer separaten Melanomstichprobe mit einem großem Anteil an Melanommetastasen (n = 243) der Antikörper SM5-1 mit den Antikörpern T311 und A103 verglichen sowie auf weitere Charakteristika im Färbeverhalten untersucht. Insgesamt wurden in dieser Stichprobe 344 verschiedene Melanomgewebe untersucht.

Bei den primären Melanomen (n = 101, siehe 4.6 Tabelle 11) waren bei den untersuchten Fällen alle Antikörper etwa gleich effektiv, mit Färbungen bei 90% (T311), 95% (SM5-1) und 97% (A103). Auch hier wurde das Färbeverhalten nicht durch den histologischen Typ (superfiziell spreitend, nodulär, lentigo maligna, akro-lentiginös) oder den Clark Level beeinflusst. SM5-1 zeigte erneut keine signifikanten Vorteile beim Färben von Primärtumoren im Vergleich mit den verwendeten Antikörpern T311 und A103.

Ein ganz anderes Bild gab es bei den Metastasen, bei denen eine sehr große Anzahl von Läsionen (n = 243) analysiert wurde. Bei dieser Metastasenstichprobe war für SM5-1 eine Reaktivität von 91% zu sehen (siehe 4.7 Tabelle 11). Obwohl dies etwas weniger ist als die 96%, welche im ersten Teil dieser Arbeit bei der anderen Metastasenstichprobe gefunden wurde, ist die Sensitivität noch sehr bemerkenswert. Im Gegensatz zu SM5-1 lagen die Färbungen für Metastasen für A103 bei nur 77% und für T311 bei 63%, wodurch eine große Anzahl von Läsionen mit A103 und T311 mittels Immunhistochemie unaufgedeckt blieb. Die 77% für A103 stimmten mit den von Jungbluth gefundenen 81% überein⁽²⁸⁾, sind aber weniger als die in anderen Berichten gefundenen 86% - 89%.^(50;69) Die 63% positiver Färbungen mit T311 bei Metastasen sind weniger als die bisher berichteten 75 - 100%.^(31;50;53;69-71) Warum die hier gefundenen Ergebnisse im Fall von T311 nicht mit der veröffentlichten Literatur korrelierten, ist unklar. Technische Gründe sind sehr unwahrscheinlich, weil 68% der primären und 29% der metastasierten Läsionen mit diesem Antikörper stark oder sehr stark gefärbt wurden. Außerdem wurden verschiedene Antigenerkennungsmethoden getestet. Eine Behandlung von 5 Minuten bei

530 W in einer Mikrowelle in Verbindung mit Citratpuffer hat sich als optimal gezeigt. Andererseits hat keine der bisherigen Studien eine so große Anzahl von Läsionen ($n = 243$) untersucht, was sicher zu einer erhöhten Genauigkeit beiträgt. Im einzelnen ist früher von 19⁽⁵³⁾, 20⁽⁷¹⁾, 30⁽⁶⁹⁾, 62⁽⁷⁰⁾ und 72⁽⁵⁰⁾ untersuchten Läsionen berichtet worden. Diese relativ kleinen Zahlen machen Aussagen über den Prozentsatz positiver Tumorproben offenkundig schwierig. In der Originalveröffentlichung⁽²⁴⁾ des Antikörpers T311 wurden 16 Melanomproben getestet und nur 11 waren für T311 positiv. Wenn man hier einen Prozentsatz ermittelte, betrüge dieser 68%, was mit den hier gefundenen Ergebnissen übereinstimmt. Man könnte argumentieren, dass die relativ geringe Positivität von T311 bei den hier verwendeten Metastasenproben das Ergebnis einer außergewöhnlich hohen Anzahl amelanotischer Proben sein könnte. Obwohl die Proben nicht unter diesem Gesichtspunkt untersucht wurden, ist dies wahrscheinlich irrelevant, weil gezeigt wurde, dass die meisten der amelanotischen Proben sowohl für Tyrosinase mRNA, als auch für T311 positiv sind.⁽²⁴⁾

In dieser Arbeit konnten von 56 A103-negativen Läsionen 52 (93%) durch Färbung mit SM5-1 korrekt als Melanomläsionen identifiziert werden (siehe 4.8 Tabelle 12). Von den 89 T311-negativen Läsionen waren 81 (91%) für SM5-1 positiv. 38 Metastasen (15%) waren sowohl für A103, als auch für T311 negativ, aber 35 (92%) davon färbten sich mit SM5-1 positiv. Diese Ergebnisse deuten nicht nur auf eine höhere Sensitivität von SM5-1 für Melanommetastasen im Vergleich zu A103 und T311, sondern unterstreichen auch den Wert von SM5-1 für die korrekte Identifizierung von Tumoren, welche keine Melanom-assoziierten Antigene (MAA) besitzen.

In Stichprobe I, bei der SM5-1 mit dem hochspezifischen Antikörper HMB-45, welcher das MAA gp100 erkennt⁽²³⁾, verglichen wurde, stellte sich ebenso heraus, dass alle 45 HMB-45-negativen Metastasen von SM5-1 korrekt als Melanome identifiziert wurden. Die Frage, ob negative Metastasen für HMB-45, Melan-A/MART-1 und Tyrosinase von SM5-1 erkannt werden können, war daher interessant. Da alle Läsionen sowohl mit anti-S100 gefärbt, als auch auf Grund histomorphologischer Kriterien von erfahrenen Dermatohistopathologen eindeutig als Melanommetastasen identifiziert wurden, konnte diese Frage mit ja beantwortet werden.

5.4 Färbeintensitäten von SM5-1, A103 und T311

Um das immunhistochemische Verhalten des Antikörpers SM5-1 genauer kennen zu lernen, wurde das Färbeverhalten nach Färbeintensität und –muster beurteilt und mit den Antikörpern A103 und T311 verglichen.

Bei der Analyse der Färbeintensität (siehe 4.9 Tabelle 13) hatte SM5-1 eine leicht betontere Färbung als die anderen untersuchten Antikörper und war bei 75% aller primären Melanome und 64% aller Metastasen stark oder sehr stark positiv. A103 (67% primär, 35% metastasiert) und T311 (68% primär, 29% metastasiert) hatten für den gleichen Grad der Färbeintensität einen wesentlich geringeren Prozentsatz erreicht. Gesamtfärbung und Färbeintensität von A103 und T311 bei primären Melanomen stimmten mit früheren Berichten überein.^(49;51;53)

Auch die durchschnittliche Intensität der Färbung in den metastasierten Läsionen wurde analysiert (siehe 4.9 Tabelle 13). Bei Melan-A/MART-1 waren 23% komplett negativ und 42% schwach bis mäßig gefärbt. Nur 35% der Läsionen waren stark oder sehr stark gefärbt. Noch auffallender waren die Ergebnisse bei Tyrosinase. Während 37% komplett negativ waren, waren weitere 34% schwach bis mäßig positiv und nur 29% wiesen eine starke oder sehr starke Färbung auf. Bei SM5-1 waren 9% negativ, 27% schwach oder mäßig und 64% stark oder sehr stark gefärbt. Anders ausgedrückt, 155 von 243 Metastasen färbten sich mit SM5-1 stark oder sehr stark, während dies bei A103 bzw. T311 nur in 85 bzw. 70 Fällen erfolgte. Somit zeigte sich für SM5-1 eine klare Überlegenheit zu den anderen untersuchten Antikörpern in Bezug auf die Intensität der Färbungen. Insbesondere galt dieses für durch SM5-1 gefärbte Metastasen.

5.5 Färbemuster von SM5-1 innerhalb einer Tumorzellpopulation im Vergleich zu A103 und T311

Bei der Analyse des Prozentsatzes der gefärbten Tumorzellen innerhalb einer Tumorzellpopulation (siehe 4.8 Tabelle 12) färbten alle drei Antikörper die Mehrheit, d.h. mehr als 50% der Tumorzellen. Hierbei zeigte sich jedoch SM5-1 mit 85% der Läsionen im Vergleich zu A103 mit 68% und T311 mit 63% überlegen. Dies stimmte mit der früher untersuchten guten Färbung von A103 und T311 überein.^(31;51;53;72;73) Generell wird die immunhistologische Analyse primärer Läsionen durch unzureichende Sensitivität der verfügbaren Melanomantikörper nicht

gestört. Dies wurde durch diese Ergebnisse bestätigt. Auch bei der Beurteilung des Färbemusters des Antikörpers SM5-1 innerhalb einer Tumorzellpopulation, war dieser den anderen beiden Antikörpern überlegen. Es wurden durchschnittlich 20% mehr Zellen innerhalb einer Tumorzellpopulation gefärbt.

5.6 Konkordanter Antigenverlust bei primären und metastasierten Melanomen

Es war zu beobachten, dass 38 (15,6%) der 243 Metastasen einen konkordanten Verlust von Melan-A/MART-1 und Tyrosinase hatten. Dahingegen war rechnerisch eine Negativität von 8,4% zu erwarten. Eine gleichzeitige Negativität von Melan-A/MART-1, Tyrosinase und SM5-1 wurde aber nur bei 1,2% der Metastasen beobachtet, was den Wert des Einsatzes von SM5-1 bei Tumorantigen-negativen Läsionen unterstreicht.

Der konkordante Verlust der melanozytären Differenzierungsantigene (MDA) gp100, Melan-A/MART-1 und Tyrosinase wurde von Slingluff et al. beschrieben.^(74;75) Dieser Verlust scheint das korrespondierende Antigen von SM5-1 nicht zu betreffen, weshalb dieses sehr wahrscheinlich kein MDA ist. Es ist bisher nicht bekannt, ob es als Tumorabstoßungsantigen dient und ob zytotoxische T-Zellen dieses Antigen erkennen können bzw. ob es somit einen eventuellen Stellenwert für die Immuntherapie des Melanoms mittels Vakzinierung haben könnte.

5.7 Schlussfolgerungen über den Antikörper SM5-1

Aus bisher bekannten Untersuchungen über Antikörper, die der immunhistochemischen Melanomdiagnostik dienten und den hier vorgestellten Ergebnissen kann man schließen, dass der neue hier untersuchte Antikörper SM5-1 mehrere Vorteile gegenüber den vorher bekannten und untersuchten Antikörpern in der Immunhistochemie von Melanomen hatte. So war SM5-1 spezifischer für Melanome als anti-S100 und sensitiver für metastasierte melanozytäre Läsionen als der gebräuchliche Antikörper HMB-45 und die Antikörper A103 und T311. Des Weiteren zeigte SM5-1 einen besonderen Vorteil bei der Färbeintensität für Melanommetastasen und bei der Anzahl der gefärbten Zellen einer Tumorzellpopulation. Diese Schlussfolgerungen wurden zum Teil durch eine weitere Studie unterstützt, in der die Expression von gp100, Melan-

A/MART-1, Tyrosinase und S100 bei primären und metastasierten Melanomen verglichen wurde.⁽⁷⁶⁾ Die Autoren fanden, dass die Sensitivität von anti-S100 die Sensitivität aller anderen Antikörper überschritten hatte. Da SM5-1 die gleiche hohe Sensitivität wie anti-S100 hat, aber für melanozytäre Läsionen spezifisch ist, während anti-S100 unspezifisch ist, kann der Gebrauch des Antikörpers SM5-1 als Antikörper der ersten Wahl für die immunhistochemische Melanomdiagnostik empfohlen werden. Es ist ebenso vorstellbar, dass mit einem radioaktiven Agens gekoppeltes SM5-1 für die Ausbreitungsdiagnostik bei Melanompatienten dienen kann. Für eine weitere genauere Charakterisierung muss jedoch noch das zugehörige Antigen untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Für die Melanomdiagnostik werden häufig die Antikörper HMB-45 und anti-S100 als immunhistochemische Routinemarker verwendet, obwohl HMB-45 nur eine Sensitivität von 67 - 93% hat und anti-S100 nicht spezifisch für das Melanom ist. Der monoklonale Antikörper SM5-1 wurde in Vorarbeiten mittels eines subtraktiven Immunisierungsprotokolls (Kooperationspartner Prof. YJ. Guo, Cleveland, USA) von einer humanen Melanom-Zell-Linie gewonnen. In der vorliegenden Arbeit wurde an unterschiedlichen nicht-melanozytären benignen Geweben, 16 Nävi, 84 nicht-melanozytären Tumoren sowie 745 Melanomproben das Färbeverhalten von SM5-1 mittels Immunhistochemie an Paraffinschnitten charakterisiert. SM5-1 wurde zunächst mit HMB-45 und anti-S100 an 250 primären und 151 metastasierten Melanomen und in einer zweiten Stichprobe mit Antikörpern gegen Melan-A/MART-1 (A103) und Tyrosinase (T311) an 101 primären und 243 metastasierten Melanomen verglichen.

Es zeigte sich, dass SM5-1 für normale Zellen der Haut und die meisten anderen normalen Zellen negativ ist. SM5-1, anti-S100 und HMB-45 färbten 100% der Nävi und 97 - 99% der 250 untersuchten primären Melanome. Während SM5-1 und anti-S100 96% der 151 Melanommetastasen korrekt identifizierten, waren für HMB-45 nur 83% der Proben positiv. Alle für HMB-45 negativen Metastasen reagierten mit SM5-1. Weder SM5-1 noch HMB-45 färbten nicht-melanozytäre Tumore, wohingegen der unspezifischere Antikörper anti-S100 21 von 84 dieser Tumore färbte. Insgesamt wurde beim primären und metastasierten Melanom für SM5-1 eine Sensitivität von 98%, für HMB-45 von 93% und für anti-S100 von 97% beobachtet. Im Vergleich der Antikörper SM5-1, A103 und T311 färbten SM5-1 92,4%, A103 82,9% und T311 71,2% der insgesamt 344 primären und metastasierten Melanome. SM5-1 zeigte innerhalb einer Tumorzellpopulation ein homogeneres Färbeverhalten und eine höhere Färbeintensität bei den 243 Melanommetastasen als A103 und T311. Die Färbeintensität der 101 Primärtumore war bei allen drei Antikörpern etwa gleich.

Der monoklonale Antikörper SM5-1 zeigte gegenüber den gebräuchlichen Antikörpern erhebliche Vorteile bei der immunhistochemischen Beurteilung des Melanoms, insbesondere bei dessen Metastasen. Somit kann er als Marker der ersten Wahl bei der immunhistochemischen Diagnostik von Melanomen empfohlen werden. Um die Rolle des durch SM5-1 erkannten Antigens am Krankheitsgeschehen des Melanoms zu verstehen, sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

7. Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Melanom, malignes; Melanozyten. 259. Aufl., Walter de Gruyter Verlag Berlin - New York, 2002:1043-1046
2. Riede U-N, Schaefer H-E. Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Aufl., aktualisierter Nachdruck, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, 2001:944-946.
3. Sebastian G, Stein A. Das maligne Melanom der Haut. UNI-MED Verlag, Bremen, 2000:11-126.
4. Reed RJ, Martin P: Variants of melanoma. Semin Cutan Med Surg. 1997;16:137-158.
5. Perniciaro C: Dermatopathological variants of malignant melanomas. Mayo Clin Proc. 1997;72:273-279.
6. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, et al.: The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res. 1969;29(3):705-727.
7. Jung EG. Dermatologie. 4. Aufl., Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1998:228-238
8. Su WP: Malignant melanoma: basic approach to clinicopathologic correlation. Mayo Clin Proc. 1997;72(3):267-272.
9. Porras BH, Cockerell CJ: Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis. Semin Cutan Med Surg. 1997;16(2):88-96.
10. Sahel JA, Albert DM: Intraocular melanomas. Cancer Treat Res. 1993;65:161-199.
11. Holman CDJ, Mulroney CD, Armstrong BK: Epidemiology of preinvasive and invasive malignant melanoma in Western Australia. Int J Cancer. 1980;25:317-323.
12. Robertson I, Cook MG, Dymock RB, Orell SR: Cutaneous malignant melanoma in South Australia. The main feature. Med J Australia. 1981;2:92-94.
13. Schreiber MM, Bozzo PD, Moon E: Malignant melanoma in Southern Arizona. Increasing incidence and sunlight as an etiologic factor. Arch Dermatol. 1981;117:6-11.

14. Little JH, Holt J, Davis N: Changing epidemiology of malignant melanoma in Queensland. *Med J Australia*. 1980;26(1):66-69.
15. Rigel DS, Kopf AW, Friedman RJ: The rate of malignant melanoma in the United States: Are we making an impact? *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(6):1050-1053.
16. Brobeil A, Rapaport D, Wells K et al: Multiple primary melanomas: implications for screening and follow-up programs for melanoma. *Ann Surg Oncol*. 1997;4(1):19-23.
17. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al: Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3635-3648.
18. Moehrle M, Blum A, Rassner G et al: Lymph node metastases of cutaneous melanoma: diagnosis by B-scan and color Doppler sonography. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41(5):703-709.
19. Zitelli JA, Brown CD, Hanusa BH: Surgical margins for excision of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(3):422-429.
20. Orchard G, Wilson JE: Immunocytochemistry in the diagnosis of malignant melanoma. *Br J Biomed Sci*. 1994;51(1):44-56.
21. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P et al: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991;254(5038):1643-1647.
22. Cochran AJ, Wen DR, Herschman HR et al: Detection of S100 protein as an aid to the identification of melanocytic tumors. *Int J Cancer*. 1982;30:295-297.
23. Adema GJ, de-Boer AJ, Vogel AM et al: Molecular characterization of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. *J Biol Chem*. 1994;269:20126-20133.
24. Chen YT, Stockert E, Tsang S et al: Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92:8125-8129.
25. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A et al: A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*. 1994;180(1):35-42.

26. Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P et al: Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1994;179(3):921-930.
27. Gown AM, Vogel AM, Hoak Det al: Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol.* 1986;123:195-203.
28. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL et al: A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:595-602.
29. Chen YT, Stockert E, Chen Y et al: Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies. *Proc natl Acad Sci.* 1994;91:1004-1008.
30. Kocher T, Schultz-Thater E, Gudat F et al: Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product. *Cancer Res.* 1995;55(11):2236-2239.
31. Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K et al: T311 - an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. *Pathol Res Pract.* 2000;196:235-242.
32. Brasseur F, Rimoldi D, Lienard D et al: Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 1995;63(3):375-380.
33. Ordonez NG, Ji XL, Hickey RC: Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. *Am J Clin Pathol.* 1988;90:385-390.
34. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A: Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistological study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol.* 1988;15:201-207.
35. Esclamado RM, Gown AM, Vogel AM: Unique proteins defined by monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol.* 1986;123:195-203.
36. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A: HMB-45 recognizes stimulated melanocytes. *J Cutan Pathol.* 1989;16:49-53.

37. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A: HMB-45 staining of dysplastic nevi. Support for a spectrum of progression toward melanoma. *Am J Pathol.* 1989;13:680-684.
38. Sun J, Morton TH jr, Gown AM: Antibody HMB-45 identifies the cells of blue nevi. An immunohistochemical study on paraffin sections. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:748-751.
39. Herrera GA, Hancock C: Specificity of antibody HMB-45. *Arch Pathol Lab Med.* 1992;116:900-901.
40. Argenyi ZB, Cain C, Bromley C et al: S100 protein-negative malignant melanoma: fact or fiction? A light-microscopic and immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol.* 1994;16:233-240.
41. Gatter KC, Ralfkiaer E, Skinner J et al: An immunocytochemical study of malignant melanoma and its differential diagnosis from other malignant tumors. *J Clin Pathol.* 1985;38:1353-1357.
42. Hachisuka H, Sakamoto F, Nomura H et al: Immunohistochemical study of S100 protein and neuron specific enolase (NSE) in melanocytes and the related tumors. *Acta Histochem.* 1986;80:215-223.
43. Kindblom LG, Lodding P, Rosengren L et al: S100 protein in melanocytic tumors. An immunohistochemical investigation of benign and malignant melanocytic tumors and metastases of malignant melanoma and a characterization of the antigen in comparison to human brain. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 1984;92:219-230.
44. Stefansson K, Wollmann RL, Moore BW et al: S100 protein in human chondrocytes. *Nature.* 1982;295:63-64.
45. Stefansson K, Wollmann RL, Moore BW: Distribution of S100 protein outside the central nervous system. *Brain Res.* 1982;234:309-317.
46. Tabuchi K, Moriya Y, Furuta T et al: S100 protein in human glial tumors. Qualitative and quantitative studies. *Acta Neurochir Wien.* 1982;65:239-251.
47. Vanstapel MJ, Gatter KC, de Wolf Peeters C et al: New sites of human S100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol.* 1986;85:160-168.

48. Drier JK, Swanson PE, Cherwitz DL et al: S100 protein immunoreactivity in poorly differentiated carcinomas. Immunohistochemical comparison with malignant melanoma. Arch Pathol Lab Med. 1987;11:447-452.
49. Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R et al: Melan-A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. Melanoma Res. 1998;84:337-343.
50. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J et al: Tyrosinase, melan-A and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. Mod Pathol. 1998;11(8):740-746.
51. Busam KJ, Chen YT, Old LJ et al: Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. Am J Surg Pathol. 1998;22:976-982.
52. Busam KL, Iversen K, Coplan KA et al: Immunoreactivity for A103, an antibody to melan-A (Mart-1), in adrenocortical and other steroid tumors. Am J Surg Pathol. 1998;22(1):57-63.
53. Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R et al: Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. J Cutan Pathol. 1998;25(4):204-209.
54. Basarab T, Picard JK, Simpson E et al: Melanoma antigen-encoding gene expression in melanocytic naevi and cutaneous malignant melanomas. Br J Dermatol. 1999;140(1):106-108.
55. Hofbauer GF, Schaefer C, Noppen C et al: MAGE-3 immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. Am J Pathol. 1997;151:1549-1553.
56. Gudat F, Zuber M, Durmuller U et al: The tumour associated antigen MAGE-1 is detectable in formalin-fixed paraffin sections of malignant melanoma. Virchows Arch. 1996;429:77-81.
57. Boenisch T (Hrsg.). Handbuch Immunchemische Färbemethoden. 3. Aufl., DakoCytomation Corporation, Carpinteria, DakoCytomation GmbH, Hamburg, 2003:5-79.

58. Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 1991;39:741-748.
59. Guo Y, Ma J, Wang J et al: Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1994;54:1561-1565.
60. Köhler G, Milstein C: Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol.* 1976;6:511-519.
61. Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ et al: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970;18:315-313.
62. Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:577-580.
63. Colombari R, Bonetti F, Zamboni G et al: Distribution of melanoma specific antibody (HMB-45) in benign and malignant melanocytic tumours. *Virchows Archiv A Pathol Anat.* 1988;413:17-24.
64. Mirecka J, Korabiowska M, Schauer A: Comparative distribution of S-100 protein and antigen HMB-45 in various types of melanomas and naevi. *Pol J Pathol.* 1995;46:167-172.
65. Shah IA, Gani OS, Wheler L: Comparative immunoreactivity of CD-68 and HMB-45 in malignant melanoma, neural tumors and nevi. *Pathol Res Pract.* 1997;193:497-502.
66. Swerdlow AJ, Storm HH, Sasieni PD: Risks of second primary malignancy in patients with cutaneous and ocular melanoma in Denmark, 1943-1989. *Int J Cancer.* 1995;61:773-779.
67. Mottollese M, Ventura I, Benevolo M et al: Immunocytochemical diagnosis of amelanotic metastatic melanoma using monoclonal antibodies HMB-45 and Ep1-3. *Melanoma Res.* 1994;4:53-58.

68. Adema GJ, Boer AJ, Van't Hullenaar R et al: Melanocyte lineage-specific antigens recognized by monoclonal antibodies NKI-beteb, HMB-50, and HMB-45 are encoded by a single cDNA. *Am J Pathol.* 1993;143:1579-1585.
69. Cormier JN, Abati A, Fetsch P et al: Comparative analysis of the in vivo expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J Immunother.* 1998;21:27-31.
70. Fetsch PA, Riker AI, Marincola FM et al: Tyrosinase immunoreactivity in fine-needle aspiration samples of metastatic malignant melanoma. *Cancer.* 2000;90:252-257.
71. Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M et al: Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 1997;71:142-147.
72. Kageshita T, Kawakami Y, Hirai S et al: Differential expression of MART-1 in primary and metastatic melanoma lesions. *J Immunother.* 1997;20:460-465.
73. Blessing K, Sanders DS, Grant JJ: Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology.* 1998;32:139-146.
74. De Vries TJ, Fourkour A, Wobbles T et al: Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res.* 1997;57:3223-3229.
75. Slingluff CL, Colella TA, Thompson L et al: Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: immune escape that may be overcome by targeting unique or undefined antigens. *Cancer Immunother.* 2000;48:661-672.
76. De Vries TJ, Smeets M, de Graad R et al: Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group. *J Pathol.* 2001;193:13-20.

8. Publikation

- Trefzer U, Rietz N, Chen Y, Audring H, Herberth G, Siegel P, Reinke S, Königer P, Wu S, Ma J, Liu Y, Wang H, Sterry W, Guo Y; SM5-1: a new monoclonal antibody which is highly sensitive and specific for melanocytic lesions. Arch Dermatol Res 2000 Dec; 292 (12): 583-9.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 17.12.2003

Susanne Reinke

10. Danksagung

Für die Möglichkeit der Promotion und die Überlassung des interessanten Themas danke ich besonders Herrn Prof. Dr. med. W. Sterry, Chefarzt der Dermatologischen Klinik der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Des Weiteren möchte ich mich an dieser Stelle bei all denen sehr herzlich bedanken, die mich bei meiner Arbeit hilfreich unterstützt und wesentlich zum Gelingen beigetragen haben:

- Herrn Dr. med. Uwe Trefzer für die ausgesprochen gute Betreuung und die zahlreichen wertvollen Ratschläge. Er hat mir mit seiner Erfahrung und seinem Wissen jederzeit gerne zur Seite gestanden.
- Frau Dr. med. Heike Audring für die Hilfe bei der histopathologischen Auswertung.
- Gunda Herberth, Karin Adrian, Peter Königer und Vera Sommer für die gute Zusammenarbeit.
- Frau Krause für die Einarbeitung in die Immunhistologie, die Bereitstellung ihrer Arbeitsmaterialien und die freundliche Hilfestellung.
- Meiner Familie für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht.
- Meinen Freunden.
- Jan Voigt.